

**A kukorica csíkoltsági vírus életciklusa és a gazdasejt
sejtciklusa közötti kapcsolat vizsgálata transzgenikus
kukorica növényekben**

Készítette: Kelemen Krisztina

**Témavezető:
Dr. Horváth V. Gábor
Professzor Dr. Dudits Dénes**

**Növénybiológiai Intézet
SZBK
MTA**

| | |
|---|----|
| I. Bevezetés | 3 |
| II. Irodalmi áttekintés | 6 |
| II.1. A sejtciklus alapmechanizmusai eukarióta szervezetekben | 6 |
| II.2. A geminivírusok genetikai felépítése..... | 8 |
| II.2.1. Az I-es típusú geminivírusok | 8 |
| II.2.2. A III-as típusú geminivírusok | 9 |
| II. 2.3. Egykomponensű II és III-as típusú geminivírusok | 11 |
| II.3. A geminivírusok replikációja..... | 12 |
| II.4 A virális gének transzkripciója | 13 |
| II.5. A komplementer és a virion-szensz promóterek..... | 15 |
| II. 6. Emlős DNS vírusok transzkripciójának szabályozása | 18 |
| II.7. Kölcsönhatás a geminivírus és a gazdasejt között | 19 |
| II.7.1. A geminivírus DNS replikációja és a gazdasejt közötti kapcsolat vizsgálata..... | 19 |
| II.7.2. A gazdasejt hatása a geminivírusok génexpressziójára | 23 |
| III. Célkitűzés | 26 |
| IV. Anyagok és módszerek..... | 27 |
| IV. 1 Szövettenyésztés..... | 27 |
| IV. 1. 1. Növényi anyagok és a sejt kultúra fenntartása | 27 |
| IV. 1.2. Protoplaszt transzformáció és növényregenerálás | 27 |
| IV. 1. 3. Sejtszinkronizálás | 28 |
| IV. 1. 4. Kondicionáló tápoldat előállítása | 29 |
| IV. 2. Molekuláris biológiai és biokémiai technológiák..... | 29 |
| IV. 2. 1. Baktériumos tápoldatok, törzsek és vektorok..... | 29 |
| IV. 2. 2. Plazmid DNS izolálás..... | 31 |
| IV. 2. 3. Emésztés restrikciós enzimekkel..... | 31 |
| IV. 2. 4. A nukleinsavak elektroforézise | 31 |
| IV. 2. 5. PCR amplifikáció | 31 |
| IV. 2. 6. Össz-RNS analízis és <i>Northern</i> hibridizáció | 32 |
| IV. 3. Sejtbiológiai technológiák..... | 32 |
| IV. 3. 1. Mitotikus index analízise..... | 32 |
| IV. 3. 2. Sejtmag izolálás áramlásos citológiai méréshez | 33 |
| IV. 3. 3. Hisztokémiai GUS aktivitás | 33 |
| IV. 3. 4. Fluorimetrikus GUS aktivitás mérés | 34 |
| IV. 3. 5. BrdU jelölés..... | 34 |
| IV. 3. 6. Élesztő két-hibrid analízis | 35 |
| V. Eredmények | 37 |
| V.1. A virális promóterek aktivitása kukorica protoplasztokban és transzgenikus kalluszokban | 37 |
| V.2. A virális promóterek aktivitása transzgenikus növények gyökereiben..... | 41 |
| V.3. A sejtosztódás hormonális indukálása elősegíti a virális promóterek működését | 43 |
| 4. A burokfehérje gén transzkriptuma a sejtciklus G2-fázisában, a replikációs fehérje gén transzkriptuma a sejtciklus S és G2 fázisában mutatott felhalmozódást | 46 |
| V. 5. A C2-es replikációs fehérje aktiválja, a burokfehérje pedig represszálja a virion-szensz gének működését. | 51 |
| V. 6. A geminivírus fehérje és a gazdasejt fehérjék közötti kapcsolat vizsgálata élesztő két-hibrid rendszer segítségével | 57 |
| VI. Megvitatás | 62 |
| VII. A fontosabb tudományos eredmények összefoglalása | 72 |
| VIII. Referencia..... | 73 |

I. Bevezetés

A növény fejlődése időben és térben szigorúan szabályozott sejtosztódási folyamatok összessége, aminek köszönhetően megfelelő helyen és megfelelő időben kialakul a növény szövetrendszere. Az utóbbi időben jelentős erőfeszítések történtek a növényi sejtosztódási folyamatok megértésére. A kis tumorvírusok analízise jelentős mértékben hozzájárult az állati sejt szabályozó mechanizmusainak és a sejtosztódás egyes lépéseinek megértéséhez. A növényi DNS vírusok hasonló módon segíthetnek számunkra a növényi sejtciklus megértésében.

A geminivírusok olyan növényi vírusok, amelyek a növények széles körét fertőzik meg, és az egész Földön jelentős termésvesztést okoznak. Nagymértékű fertőzőképességük és egyedülálló tulajdonságaik miatt (a virális genom egyes-szálú DNS-ből áll, kis genomméret, a replikáció a sejtmagban megy végbe) a geminivírusok az érdeklődés középpontjában állnak. A virális egyes-szálú DNS ikozaéderes iker részecskékben helyezkedik el. A vírus replikációja és a vírus fehérjék transzkripciója a kettős-szálú átmeneti formán keresztül történik. A vírus saját életciklusához csak kevés számú fehérjét képes biztosítani. Mivel egyik vírusfehérje sem rendelkezik DNS-polimeráz aktivitással, a vírus kénytelen a gazdasejt replikációs mechanizmusait felhasználni saját DNS-ének replikációjához. Vannak olyan geminivírusok, amelyek floem specifikusak (Sanderfoot és Lazarowitz, 1996b) és a prokambiális sejtekben jelenlévő replikációs enzimeket használják fel a vírus genom replikációjához. Más geminivírusok esetében azonban a vírus jelenléte nem korlátozódik a prokambinális sejtekre, azaz a vírus a növény különböző részein a terminálisan differenciálódott sejtekben is kimutatható. A kifejlett növény legtöbb sejtje elhagyja a sejtosztódási ciklust és különböző mértékű differenciálódáson esik át, így nem tartalmazza a replikációs enzimeket (Nagar és mts., 1995). Mivel a terminálisan differenciálódott sejtekben a replikációs enzimek csak vírusfertőzés után mutathatók ki, feltételezhetjük, hogy ezek a geminivírusok képesek átprogramozni és az az osztódási ciklusba visszajuttatni a gazdasejtet és így egy a replikációnak megfelelő környezetet alakítanak ki. Újra tudják indítani például a terminálisan differenciálódott sejtekben olyan gének expresszióját, amelyek a sejtciklus S-fázisában működnek. Az

emlős DNS tumor vírusok hasonló módon függnek a gazdasejt replikációs fehérjéitől, és képesek beindítani a replikációs enzimek termelődését azokban a sejtekben, amelyek előzőleg már elhagyták a sejtosztódási ciklust (Jansen-Durr, 1996).

Azt a lehetőséget, hogy a vírus életciklusa és a gazdasejt sejtciklusa között szoros kapcsolat létezhet, más tények is alátámasztják. A gyűszűvirág csíkoltsági vírus (DSV) kettős-szálú replikatív DNS formája a sejtciklus S-fázisában sokkal nagyobb mennyiségben van jelen, mint más osztódási fázisokban (Accotto és mts., 1993). Ez a tény arra utalhat, hogy a geminivírusok valamilyen módon képesek saját replikációs mechanizmusukat hozzáigazítani a gazdasejt DNS-ének replikációjához (Gutierrez, 2000).

Csoportunkban kimutattuk, hogy az általunk vizsgált kukorica csíkoltsági vírus (maize streak virus (MSV)) replikációs fehérje hozzákapcsolódik az egyik legfontosabb tumor szupresszorhoz, az emberi retinoblasztóma (Rb) és a kukorica retinoblasztóma homológ fehérjéhez élesztő két-hibrid rendszerben (Horváth VG és mts., 1998). Állati rendszerekben az Rb családba tartozó fehérjék a sejtciklus fontos negatív szabályozói, és a sejteket a G1-fázisban gátolják. Emlős DNS tumor vírusfertőzés hatására a sejtek azonban felszabadulnak a gátlás alól, és eljutnak a sejtciklus egy olyan fázisába, ami a vírus replikációsciklusának megfelel (Gutierrez, 2000). Feltételezhetően a növényi retinoblasztóma fehérjék is ilyen gátló szerepet játszanak a növény sejtciklusában, és ez alól a gátlás alól szabadul ki a sejt geminivírus fertőzés hatására.

A geminivírusok vizsgálata valószínűleg lehetővé teszi, hogy a növényi DNS replikációjáról, a növényi gének expressziójáról és a sejtciklus szabályozásának mechanizmusairól további információkat szerezzünk. Munkánk során az MSV életciklusa és a kukorica sejt sejtciklusa között lévő kapcsolatot vizsgáltuk transzgenikus kukorica növényekben és az élesztő két-hibrid rendszer segítségével. Csoportunkban egyedülállóan rendelkezésünkre áll egy jól transzformálható és jól regenerálódó kukorica vonal, amely hosszú évek munkájának eredményeként használhattunk fel transzgenikus növények előállítására (Mórocz és mts., 1990). Kísérleteink során arra a kérdésre kerestünk választ, hogy az MSV promóterek

működése a sejtciklus szabályozása alatt áll-e, és, hogy az MSV replikációs fehérje milyen eddig nem ismert sejtciklus szabályozó fehérjével mutat kölcsönhatást.



II. Irodalmi áttekintés

II.1. A sejtciklus alapmechanizmusai eukarióta szervezetekben

A sejtciklus alapmechanizmusai az eukarióta rendszerekben nagy fokú konzerváltságot mutatnak (Doonan és mts., 1997; Dudits és mts., 1998). Az eukarióta sejtciklus során két fontos ellenőrzőpont létezik: az egyik a késői G1 fázisban, a DNS replikációja előtt, a másik pedig a G2/M fázis határán, a mitózis előtt. A sejtciklusban történő előrehaladásért különböző ciklin-függő kináz (CDK) komplexek felelősek, amelyek katalitikus alegységként egy kb. 34 kDa fehérjét (CDK) valamint ciklin szabályozó alegységet tartalmaznak (Morgan és mts., 1995). A sejtciklus egyes lépéseinek finom szabályozása ezeken a CDK komplexeken keresztül történik. A sejtciklus kontroll másik fontos, a különböző organizmusokban jelenlévő komponense a retinoblasztóma fehérje, amely más, jelenleg még ismeretlen fehérjék közreműködésén keresztül irányítja a tumoros sejteket a végnélküli osztódások felé.

A sejtciklus szabályozás tanulmányozása a hetvenes évek elején élesztő sejteken kezdődött. A hasadó élesztők (*Schizosaccharomyces pombe*) tipikus sejtciklust mutatnak két köztes (G1, G2), egy szintetikus (S) és egy osztódó (M) fázissal. Két fontos tényező befolyásolja a ciklus folyamán az előrehaladást: a sejt méret és a DNS károsodása. A sejt méret mindkét ellenőrzőpontra, tehát a G1 és a G2 átmenetnél is fontos, és a sejt nem folytathatja a ciklust egészen addig, amíg a kritikus méretet el nem éri. A DNS károsodás kontrollja a G1 fázisban működik, és a sejtciklus lelassulását, sőt esetenként a megállását is okozza. Így a javítómechanizmus számára elegendő idő áll rendelkezésre a hibák kijavítására. Élesztő sejtciklus mutánsok analízise vezetett a p34-kináz központi jelentőségének felismeréséhez. A p34-kináz szabályozó feladatot lát el a mitotikus-fázisban és a G1- valamint S-fázisokban egyaránt. A G2/M-fázisok közötti átmenethez szükség van az aktív p34-kinázra, amely komplexet képez a ciklinekkel (Alberts és mts., 1994). A p34 és a B típusú ciklin között a G2/M határán kialakuló komplex (MPF) a sejteket az M fázis felé irányítja. Az S-fázist serkentő faktor (SPF) az élesztők esetében a p34-

kinázt és a G1-ciklineket foglalja magában és a DNS szintézis felé tereli a sejteket.

Hasonlóan a többi eukarióta szervezetekhez, a növényi sejtek osztódása is négy, szigorúan meghatározott fázisra bontható. A testi sejtek megduplázódásának és két utódsejt létrejöttének folyamatában az S-fázis alatt történik meg a DNS-állomány megkétszereződése, és a mitózis (M) fázis folyamán játszódik le a kromoszómák szétválása. A G1- és G2-fázisok e két fontos folyamatot készítik elő. A sejtciklus hossza fajonként, szövet- és sejttypusonként változhat. Kukoricagyökér merisztématikus sejtjeiben a G1-fázis 2-4; az S-fázis 9-11; a G2- fázis 6-7; a mitózis 2-4 órát vesz igénybe. A növényi sejtek osztódási ciklusa az emlős sejtektől eltérően, egyaránt megszakadhat a G1-, illetve a G2-fázisban. A hormonális reaktivációnak (pl. auxinhatás) kiemelt szerepe van a ciklus újraindításában. A ciklus folyamata szabályozható különböző fázisokban gátló vegyületek adagolásával. A G1/S-, illetve korai S-fázisban ható és leggyakrabban használt szinkronizáló szerek a hidroxürea és az afidikolin (Dudits, 1999). A növényi sejtekben működő sejtciklus-szabályozási mechanizmusok az élesztőkhöz viszonyítva összetettebb rendszerek. Jelentős mértékben nőtt a száma azoknak a géneknek, amelyek különböző sejtciklus szabályozó fehérjéket kódolnak. Az élesztőkben található és több funkciót is ellátó p34 helyett a növényi sejtekben egy egész kinázcsalád (CDK) különböző tagjai lépnek kapcsolatba a sejtciklus különböző fázisaiban más-más ciklinekkel (Nigg, 1995). Napjainkban egyre több információ áll rendelkezésünkre ezeknek a géneknek a transzkripció, hormonális szabályozásáról (Doonan, 2000; Mészáros és mts., 2000; Pasternak és mts., 2000). A CDK-k különböző ciklinekkel való asszociációja a felelős a G1/S és a G2/M átmenet szabályozásáért (Huntley és Murray, 1999). Annak ellenére, hogy a kontroll mechanizmusok minden eukarióta élőlényben jelen vannak, az egyes lépések között különbség tapasztalható. A növényekben például az élesztőtől és az állati sejtektől eltérően nemcsak a ciklinek, hanem a CDK variánsok génjei is sejtciklus fázis függő kifejeződést mutatnak (Dudits és mts., 1998; Magyar és mts., 1997). A jelenleg rendelkezésre álló szekvenciaadatok alapján az izolált növényi gének elsősorban mitotikus ciklineket kódolnak. A növényi ciklinek egyaránt hasonlóságot mutatnak az A és a B típusú ciklinekhez (Renaudin és mts., 1994). Ugyanakkor a sejtciklus gének expressziós mintázata az élőszervezetek széles

spektrumában erős konzerváltságot mutat, az élesztőktől kezdve a növényeken keresztül az állatokig. Azok a gének például, amelyek a DNS replikációval kapcsolatos fehérjéket kódolnak, mint pl. a replikáció-függő hiszton gének (Chaubet és mts., 1998), főleg a sejtciklus S-fázisában expresszálódnak.

Állati sejtekben a retinoblasztóma (pRb) egy géncsalád része, ide tartoznak a p107 és a p130 fehérjét kódoló gének is (Herwig és Strauss, 1997). Növényi pRb homológokat kukoricából (Grafi és mts., 1996; Xie és mts., 1996; Ach és mts., 1997), dohányból (Nakagami és mts., 1999) és *Arabidopsis*-ből (Kong és mts., 2000) sikerült kimutatni. Az emlős sejteken végzett kísérletek arra utalnak, hogy a pRb család tagjai negatívan szabályozzák a sejtciklust, és a differenciálódást segítik elő (Sidle és mts., 1996). A kukorica pRb homológok is főleg a kifejlődött levél sejtjeiben expresszálódnak (Huntley és mts., 1998), ami arra utalhat, hogy ezek a fehérjék növényi sejtekben is hasonló funkciót látnak el.

II.2. A geminivírusok genetikai felépítése

A geminivírusok egyes-szálú cirkuláris DNS vírusok. A virális DNS iker részecskékben helyezkedik el, és a mérete kis 2,5-3 kb között változik. A virális genom tartalmaz két intergenikus szakaszt. A nagy intergenikus szakaszban (LIR) a vírus replikációjáért, a virális gének expressziójáért és a bepakolódásért felelős szekvenciák, a kicsi intergenikus szakaszban (SIR) a poliadenilációs szignálok találhatóak. A virális DNS kódoló kapacitása a különböző geminivírusok esetében más és más: az I-es típusú vírusnál a virális genom négy fehérjét, a II-es és a III-as vírusok esetében pedig hat-hét fehérjét kódol.

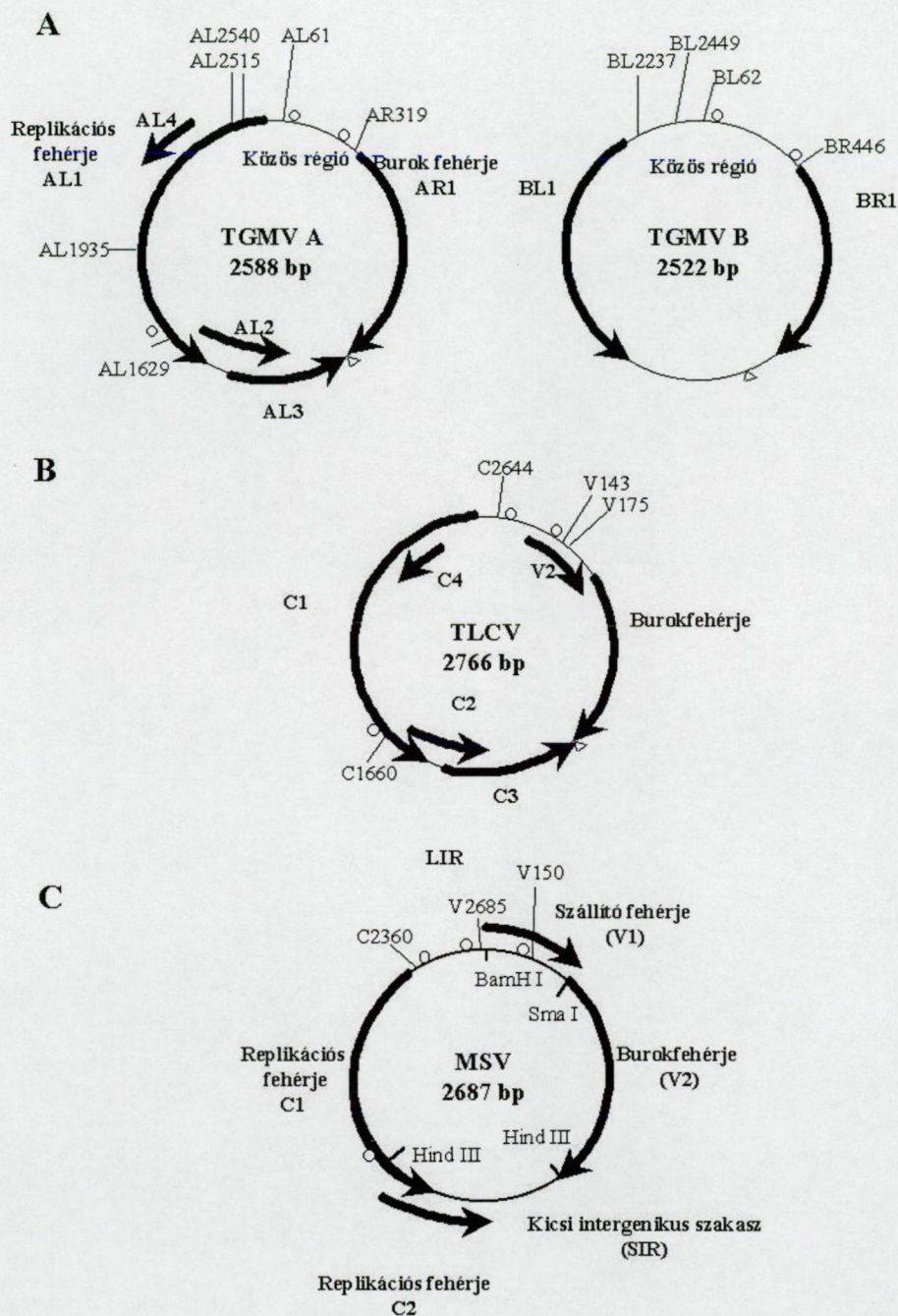
II.2.1. Az I-es típusú geminivírusok

Ezeknél a vírusoknál csak olyan fajokat találtak, ahol a virális genom osztatlan, azaz csak egyetlen DNS szálból áll. Amint az 1/B ábrán látható az általunk behatóbban vizsgált MSV esetében is egyfajta DNS-ből áll a virális genom, és négyféle fehérjét kódol (Mullineaux és mts., 1984; Lazarowitz, 1992). Kettőnek (C1,

C1C2) az átíródása a komplementer szálról, kettőnek pedig (*V1*, *V2*) a virion-szensz szálról történik (Morris-Krsinich és mts., 1985). Virion-szensz szálon azt a DNS-t értjük, amelyik a kapszidban is megtalálható, a komplementer szálon azt, amelyik csak a kettős-szálú replikatív formában van jelen. A mutációs analízisek azt mutatják, hogy a *C1* és a fúziós *C1C2* fehérje a vírus replikációjáért (Boulton és mts., 1989, 1993; Lazarowitz, 1989), a *V1* fehérje pedig a növényen belüli elterjedésért felelős. A *V2* fehérje a vírus burokképződéséért (Boulton és mts., 1989;1993). A vírus szensz szálaról két mRNS szintetizálódik, az egyik kisebb mennyiségben termelődik, erről történik meg a *V1* fehérje transzlációja, a másik, nagyobb mennyiségben termelő mRNS-ről a *V2* fehérje transzlációja megy végbe. Megközelítőleg tízszer több *V2* mRNS képződik, mint *V1*. A komplementer szálról egy mRNS termelődik. Mutációs analízisekkel kimutatták, hogy a *C1* fehérje erről az RNS-ről transzlatálódik. A komplementer szálról képződő RNS érése (intron kivágódás) során, egy fúziós fehérje, a *C1C2* fehérje képződik. Az intron kivágódás jelentőségét Wright és munkatársai (1997) bizonyították. Kimutatták, hogy abban az esetben, ha az intron kivágódásért felelős szekvenciában mutáció történik, ez a vírus replikációját gátolja.

II.2.2. A III-as típusú geminivírusok.

A III-as típusú geminivírusok esetében a virális genom két különböző DNS-ből, a DNS A-ból és a DNS B-ből áll. Amint az 1/A ábrán a paradicsom arany mozaik vírus (TGMV) példáján látható (Hamilton és mts., 1984), mind a két DNS-en lévő fehérjékre szükség van a hatékony fertőzéshez. A mutációs analízisek azt



1. ábra. A geminivírusok felépítése. Az ábra A részén a III-as típusú TGMV két komponensű genomja, a B ábra részleten a II típusú TLCV, a C panelen az MSV vázlatos képe látható. Az egyes DNS-ek méretét az ábrán feltüntettük. A fekete nyílak a nyitott leolvasási kereteket és azok transzkripciójának irányát jelzik. A virális mRNS 5' végét a genomi elhelyezkedés alapján feltüntettük. A körök a TATA-boxokat, a háromszögek a poliadenilációs szignálokat jelzik.

mutatják, hogy az A komponens a B jelenléte nélkül is képes replikálódni és bepakolódni. A B komponens az A DNS által kódolt fehérjék jelenléte nélkül nem képes replikálódni, ugyanakkor ennek a komponensnek fontos szerepe van a növény szisztematikus fertőzésében és a vírusfertőzésre jellemző szimptómák kialakulásában (Sanderfoot és mts., 1996a).

Az A DNS öt fehérjét kódol. Négynek a transzkripciója (*AL1*, *AL2*, *AL3*, *AL4*) a komplementer szálról, egynek pedig (*AR1*) a virion-szensz szálaról megy végbe. A B DNS két fehérjét kódol, az egyik transzkripciója a komplementer szálról (*BL1*), a másik fehérje transzkripciója pedig a szensz szálról (*BR1*) történik. Az *AL1*, *AL2*, *BL1* és *BR1* gének mutációja gátolta a vírusfertőzést. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy ezeknek a fehérjéknek fontos szerepük van a vírus életciklusában. Az *AL1* mutációja gátolta a vírus replikációját, az *AL3* gén mutációja pedig erőteljes csökkenést idézett elő a virális DNS szintjében (Sung és Coutts, 1995). Az eredmények jelzik, hogy mindkét génnek fontos szerepe van a vírus replikációjában. Az *AR1* és *BR1* gének mutációja hatással van az egyes-szálú DNS (ssDNS) felhalmozódására, amiből arra következtethetünk, hogy az itt kódolt fehérjéknek fontos szerepük van a ssDNS sejten belüli elkülönítésében (Padidam és mts., 1996). Bizonyítást nyert, hogy az *AR1* a vírus burokfehérjéje, a *BR1* pedig a vírus DNS sejten belüli szállításában játszik szerepet. Az *AL2* gén terméke is hatással van az ssDNS felhalmozódására, feltételezhetően az *AR1* és a *BR1* gének transzaktiválása révén (Sunter és mts., 1997). A *BL1* gén mutációja nem volt hatással a virális DNS felhalmozódására, ennek a fehérjének a sejtről-sejtre való szállításban van fontos szerepe (Ward és mts., 1997). Az *AL4* fehérjének nincs észlelhető hatása a vírus replikációjára (Elmer és mts., 1988).

II. 2.3. Egykomponensű II és III-as típusú geminivírusok

Néhány, a III-as csoportba és az átmeneti csoportba (II) tartozó vírusról csak egyféle DNS található a vírus kapszidjában. Ezeknél a vírusoknál a komplementer szálon lévő gének (*C1*, *C2*, *C3*, *C4*) elhelyezkedése megegyezik a III. típusú vírus A DNS-én tapasztaltakkal, amint ez a paradicsom levélsodródási vírus (TLCV)

esetében az 1/B ábrán látható. Hasonlóan a két komponensű vírusokhoz, a C1 fehérje nélkülözhetetlen a vírus replikációjához, a C3 fehérje pedig jelentősen megnöveli a replikáció hatékonyságát. Ugyanúgy, mint az AL2 fehérje, a C2 is fontos a fertőzéshez, de az nem tisztázott, hogy transzaktiválja-e a virális gének expresszióját (Wartig és mts., 1997).

A virion-szensz szálról két fehérje termelődik, a V1, és a V2. Ennek a két fehérjének nincs hatása a vírus replikációjára, viszont mutációjuk jelentős mértékben csökkenti a vírus fertőzőképességét. Ennek feltételezhető oka a növényen belüli szállítás zavara. A V1 a vírus szállító, a V2 pedig a vírus burok fehérjeje (Wartig és mts., 1997).

II.3. A geminivírusok replikációja

Az összes geminivírus hasonló stratégiát használ a saját DNS készletének a megsokszorozására, ez pedig a gördülő kerék mechanizmusán alapuló replikáció. A folyamat két lépésből áll. Az első lépésben az egyes-szálú "pozitív" szál a templát, és ezen megy végbe a "mínusz" szál szintézise. Így létrejön a kettős-szálú replikatív forma (dsDNS). A második lépésben ez a kettős-szálú forma a templát, amiről megtörténik a "pozitív" szálak szintézise. A geminivírus replikációja során a "pozitív" szál az a DNS, ami a virionban és a dsDNS-ben is megtalálható. A "mínusz" szál azonban csak a dsDNS-ben található meg. A replikáció során a "pozitív" szál szintézisének kezdő lépése a dsDNS specifikus hasítása a konzervált nagy intergenikus szakaszban (LIR), a vírus replikációs fehérjéjének segítségével (Orozco és mts., 1996). A "pozitív" szál szintéziséért felelős további lépések jelenleg nem ismertek. Mivel a geminivírusok nem kódolnak az eddig ismert polimerázokhoz homológ fehérjét, azt kell feltételeznünk, hogy a vírus az elongációs lépésekhez a gazdasejt fehérjerendszerére hagyatkozik.

Még kevesebb információ áll rendelkezésünkre a "mínusz" szál szintéziséről. Általánosan elfogadott, hogy a "mínusz" szál szintézise teljes egészében a gazdasejt tevékenységének az eredménye, mivel a burokfehérje az egyetlen fehérje, ami a virionban kimutatható és ennek a fehérjének nincs szerepe a vírus replikációjában



(Woolston és mts., 1989). Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy mindeddig még nem sikerült minden kétséget kizáróan kizárni azt a lehetőséget, hogy esetleg nagyon kis mennyiségben más vírusfehérje is jelen van a virionban és elősegíti a "mínusz" szál szintézisét.

A gördülő kerék replikáció nagyon általános a baktérium rendszerekben. Rigden és munkatársai kimutatták (1996), hogy a TLCV képes replikálódni *Agrobacterium tumefaciens* törzsekben is. Ezek szerint a geminivírusok növényi sejtekben és növényvel kapcsolatos prokarióta rendszerekben képesek replikálódni.

II.4 A virális gének transzkripciója

A mRNS molekulákat több vírus esetében analizálták. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a geminivírus genom transzkripciója kétirányú, és mind a komplementer, mind a virion-szensz szálról íródnak át mRNS-ek. A vírus RNS-ek poliadeniláltak és a konszenzus TATA-box-tól 3' irányban az iniciális elemeknél indul a transzkripciójuk. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a virális gének transzkripciója gazdasejt RNS polimeráz II enzimével történik. A különböző alcsaládba tartozó fajok különböző expressziós stratégiákat használnak, különösen szembevetőnek az RNS érésében tapasztalható különbségek.

Az irodalmi adatok alapján a legtöbb információ a III-as csoportba tartozó TGMV transzkripciójáról áll rendelkezésünkre (Sunter és Bisaro, 1989). A TGMV A DNS-éről hat RNS szintetizálódik, a B komponensről pedig négy. Mindkét komponensről csak egyetlen egy virion-szensz RNS képződik, amiről egyik esetben a burokfehérje, másik esetben pedig a BR1 fehérje transzlatálódik. A komplementer szál transzkripciója sokkal összetettebb. Erről sok átfedő RNS képződik különböző 5' és azonos 3' végekkel. A poliadenilációs szignál a komplementer és a virion-szensz RNS-ek esetében átfedést mutat, ebből adódóan az RNS-ek végein néhány nukleotid azonos. Mindhárom a B komponens komplementer száláról képződő RNS a BL1 fehérje termelődését eredményezi. Az A komponens komplementer száláról képződő RNS-ek viszont különböző fehérjék előállításában vesznek részt. A legnagyobb

transzkriptum (AL61) átfedi az A DNS teljes baloldalát. Ez az a transzkriptum, amelyik a teljes hosszúságú AL1 fehérje termelődését eredményezi. Az AL2540 és a AL2515 RNS-ről az AL4 fehérje termelődik. Az AL1935 és az AL1629 a két legkisebb RNS, amelyekről az első nyitott olvasási keretben az AL2 fehérje, a második olvasási keretben az AL3 fehérje termelődik. Nincs olyan RNS, amelyről egyedül az AL3 transzlációja történne meg, ami jelzi, hogy ez a fehérje policisztronos mRNS-ről szintetizálódik. Ezen RNS-ek policisztronos karaktere *in vitro* transzlációval bizonyított (Thommes és mts., 1994).

A komplementer szálát illetően hasonló transzkripció stratégia tapasztalhatunk más II-es és III-as típusú vírusok esetében is (Mullineaux és mts., 1993), a virion-szensz gének transzkripciója azonban az egy komponensű geminivírusoknál sokkal összetettebb (Mullineaux és mts., 1993).

Az I-es csoportba tartozó vírusok transzkripciója szintén kétirányú és több iniciációs helyről indul el. A poliadenilációs szignálok, hasonlóan a többi geminivírushoz, átfedést mutatnak (Wright és mts., 1997). Ugyanakkor a II-es és a III-as vírusokkal ellentétben, a I-es típusú vírusok RNS-ének processzálása a virális gének kifejeződésének fontos momentuma. Az ebbe a csoportba tartozó vírusok komplementer szálán két nyitott olvasási keret található, amelyek együttesen kódolják a vírus replikációjáért felelős C1C2 (Rep) fehérjét. Ez a fehérje splicing útján keletkezik az egyetlen komplementer RNS-ről. A splicing útján kihasított szekvencia AT gazdag, és tartalmazza a hasításhoz elengedhetetlen konszenzus szekvenciákat. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a vírus RNS-ének processzálását a gazdasejt mechanizmusai végzik el. Nagyon érdekes, hogy az RNS érése nem tökéletes és a komplementer RNS-ek csak részben hasítottak. Feltételezhetően létezik egy szabályozó mechanizmus, ami megközelítően állandó arányt tart fenn az érett és az éretlen mRNS-ek között. A splicing hiányában csak a C1 fehérje transzlációja mehet végbe, bár eddig még nincs genetikai vagy biológiai bizonyítékunk a C1 fehérje fellépéséről a vírusfertőzés során. Ugyanakkor a mutációs analízisek egyértelműen azt bizonyították, hogy a Rep fehérje egyedül elegendő a vírus replikációjához. A V1 gén kódoló szekvenciájában is található intron, ami

feltételezhetően fontos szabályozó szerepet tölt be a virion-szensz gének expressziójában (Wright és mts., 1997).

II.5. A komplementer és a virion-szensz promóterek

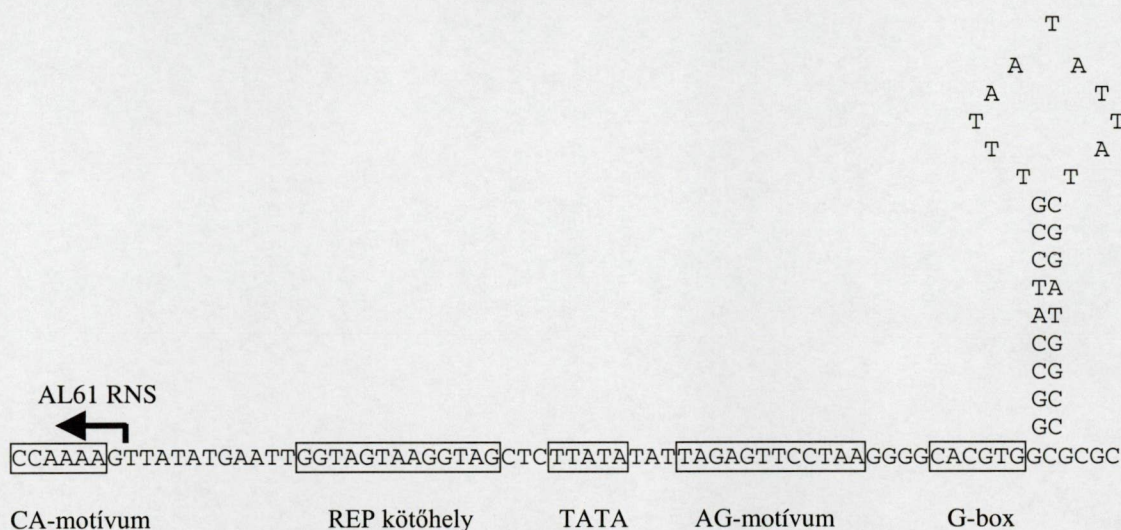
A TGMV mRNS-ek promótereinek felépítése nagyarányú hasonlóságot mutat az RNS polimeráz II által felismert promóterekhez (Sunter és Bisaro, 1989). Az *AL61* RNS az egyetlen transzkriptum, amely az *AL1* fehérje transzlációjáért felelős. Ennek az RNS-nek a promótere az úgynevezett közös régióban található, amely a gének 5' régiójának felel meg (Eagle és mts., 1994). Az afrikai kasszava mozaik vírus (ACMV) hasonló régiója transzgenikus növényekben is működőképesnek bizonyult (Zhan és mts., 1991). A komplementer promóterek azon képessége, hogy növényi rendszerekben virális fehérjék segítségével nélkül is működőképesek, nagymértékben alátámasztja azt a feltételezést, hogy a vírus gének transzkripcióját a gazdasejt transzkripciós rendszerei végzik el. Hasonlóan más vírus promóterekhez a TGMV *AL61* promóter magas szintű transzkripciót biztosít a mögötte elhelyezkedő géneknek. Deléciós analízisek segítségével kimutatták, hogy az aktivitás jelentős része annak a 60 bp-os szekvenciának köszönhető, amely közvetlenül a transzkripciós "start" hely előtt helyezkedik el (Eagle és Hanley-Bowdoin, 1997). Ez a régió, amely teljes mértékben egybeesik a "pozitív" szál origójával, egy TATA-boxot és egy G-box motívumot tartalmaz (2. ábra). Mutáció bármelyik konzervált régióban jelentős mértékben csökkenti a promóter működését (Eagle és Hanley-Bowdoin, 1997). Egyes TATA és G-box mutánsok defektesnek bizonyultak a vírus replikációjában is.

A TGMV *AL61* promóter magába foglalja a Rep fehérjekötő helyet is, ami a transzkripciós start hely és a TATA-box között helyezkedik el. Az *AL61* promóter működése autoregulált a Rep fehérjén keresztül. A Rep és az *AL4* fehérjék egyaránt gátolják az *AL61* promóter működését, de más és más szekvencia elemeken keresztül fejtik ki hatásukat (Eagle és Hanley-Bowdoin, 1997) (2. ábra).

A komplementer promóterek felépítése más II és III csoportba tartozó vírusok esetében is a TGMV *AL61* promóteréhez hasonló, ezért feltételezhető, hogy

szabályozásuk is hasonló. Az ACMV vírus *AC1* promótere is gátlódik a saját Rep fehérjéje hatására (Hong és Stanley, 1995). Ugyanakkor néhány fontos különbség is tapasztalható az ACMV és a TGMV promóterek között. Az *AC1* promóter nem tartalmaz G-box elemet, az aktiválódása több különálló cisz elemnek tulajdonítható, továbbá az *AC1* promóter nem represszálódik a C4 fehérje jelenlétében (Hong és Stanley, 1995).

A TGMV B komponens komplementer promótere szintén tartalmaz olyan szekvenciákat, amelyek az *AL61* promóterhez homológiát mutatnak, azonban ez a promóter nem gátolható a Rep fehérjével. Ez arra utal, hogy a BL1 fehérje termelődése más módon szabályozott (Sunter és mts., 1993).



2. ábra. A TGMV replikációs origója és a *AL61* promóter vázlatos képe. A hajlított szerkezet a vírus replikációjához elengedhetetlenül fontos. Az *AL61* RNS transzkripciójának irányát nyíllal jelöltük. A promóter funkcionális elemeit keretbe foglaltuk (Eagle és Hanley-Bowdoin, 1997).

A TGMV virion-szensz promótereinek működéséről elég kevés információ áll rendelkezésünkre. A tranziens kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a “közös” régió és az e mögött elhelyezkedő 5' oldali szekvenciák, amelyek magukba foglalják a TATA-boxot és a transzkripció iniciációs helyet elégségesek a virion-szensz gének transzkripciójához. A virion-szensz gének expressziójához az *AL2* fehérje jelenléte nélkülözhetetlen (Sunter és mts., 1997). Hasonlóképpen az ACMV vírus *AC2* replikációs fehérje szintén nélkülözhetetlen a virion-szensz gének működéséhez

(Haley és mts., 1992). Jelenleg nem ismert, hogy az AL2 fehérje milyen cisz elemekhez kapcsolódik a virális DNS-en belül.

Sunter és Bisaro (1997) kimutatták, hogy a virion-szensz gének transzkripciójának szabályozása nagyon komplex. Létrehoztak olyan transzgenikus dohány növényeket, amelyek a "közös" régiót és az azzal szomszédos határoló szekvenciákat a β -glükoronidáz (GUS) riportergénnel fúzióáztatva tartalmazták. A transzgenikus növények analízisének a floem sejtekben mutattak ki kék festődést. A floemspecifikus expresszió a növény fejlődése során szabályozottnak bizonyult és a promóter a csírázás után 14 napig nem kapcsolt be. Ha azonban a transzgenikus növény a promóter régió mellett tartalmazta az AL2 fehérjét is, a mezofil sejtekben kék festődést tapasztaltak. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a virion-szensz gének működésének a szabályozása különböző szövetekben különböző módon működik. Az AL2 fehérje a mezofil sejtekben aktiválja, a floem sejtekben viszont represszálja a burokfehérje gén expresszióját. A génkifejeződés szabályozásában virális és gazdasejt fehérjék egyaránt résztvesznek.

Az AL2 gén transzkripció szabályozása jelenleg még nem tisztázott. Ennek a génnek a promótere az AL1 gén kódoló régiójában található. Az egyik feltételezés szerint az AL61 promóter negatívan befolyásolja az AL2 promóter működését. Az AL61 promóter és a B komponens hasonló régiója a vírusfertőzés korai szakaszában aktív. Amikor elegendő mennyiségű Rep és/vagy AL4 fehérje képződött, ezek a promóterek gátlódnak, és így már nem befolyásolják negatívan az AL2 és más, 3' irányban elhelyezkedő promóterek működését. Ezáltal az AL2 és a BL1 promóterek a vírusfertőzés középső szakaszában aktiválódnak. Végül a vírusfertőzés késői szakaszában az AR1, és a BR1 promóterek indukálódnak, feltételezhetően a vírus replikációja és az AL2 fehérje szintézise után (Hanley-Bowdoin és mts., 1999). Ez az expressziós modell Howard és munkatársainak a nevéhez fűződik (1985). Dohány protoplastokban TGMV fertőzés után 18 órával kimutatható a dsDNS, de csak 18-24 óra között tapasztalható a ssDNS jelenléte. Az AR1 gén expressziója nem függött a vírus replikációjától, de 60-80-szor több burokfehérje képződött a replikálni képes vektorról, összehasonlítva a replikálni nem képes vektorral. Ez az eredmény arra

utal, hogy a geminivírus replikáció és transzkripció koordináltan működik (Brough és mts., 1992).

Nagyon kevés információ áll rendelkezésünkre a I-es típusba tartozó geminivírusok promótereinek működéséről. Három konszenzus TATA szekvencia található az MSV genomjában, amelyeknek szerepük lehet a komplementer szál transzkripciójában (Boulton és mts., 1991). Abban az esetben, ha az egyik TATA-boxban mutáció történik, a vírus által előidézett szimptomák erőteljes csökkenését tapasztaljuk feltételezhetően azért, mert a Rep fehérje termelődése vagy a vírus replikációja gátolt. Ezzel ellentétben virion-szensz gének transzkripciójában csak egy TATA-box vesz részt. A virion-szensz gének transzkripcióját kukorica protoplasztokban is vizsgálták úgy, hogy a riporter gén elé az MSV 5' LIR régióját kapcsolták. Fenoll és munkatársai (1988) kimutatták, hogy ebben a régióban található egy GC gazdag box, amely erőteljesen aktiválja a virion-szensz gének transzkripcióját. A kukorica sejt extraktumban található egy olyan fehérje, ami vagy amelyek kötődnek ehhez a GC gazdag boxhoz. Ez a fehérje feltételezhetően a kukorica egyik transzkripciós faktora, ami egyben a virion-szensz gének transzkripcióját is szabályozza. Az MSV GC gazdag box régiója és a TGMV G-box elemek felépítése hasonló (Arguello-Astorga és mts., 1994).

A „wheat dwarf vírus” (WDV) és a „chloris striate mosaic virus” (CSMV)-nak is a virion-szensz promótere a C2 vagy a Rep fehérje segítségével nagymértékben aktiválható (Hofer és mts., 1992; Zhan és mts., 1993). Tehát hasonlóan a többi geminivírushoz, az I-es típusba tartozó vírusok feltételezhetően szintén kódolnak egy transzkripciós faktor fehérjét, amely a virion-szensz gének transzkripcióját aktiválja.

II. 6. Emlős DNS vírusok transzkripciójának szabályozása

Kétoldalú transzkripció és alternatív mRNS érés alkalmazása más DNS vírusok esetében is tapasztalható. Az egyik legjobban jellemzett vírus a papova csoportba tartozó, simian virus 40 (SV40) (Depamphilis, 1987). Az SV40 genomjában két expressziós egység működik, amelyeknek a transzkripciója kétirányú. Az egyik egység a korai géneket kódolja, amelyeknek fontos szerepük van a replikációban és

gén expresszióban. A másik egység a késői géneket kódolja, erről általában a vírus struktúrfehérjei termelődnek. A korai gének a vírus replikációja előtt, a késői gének pedig a replikáció után szintetizálódnak. Az SV40 szintén alkalmazza az alternatív splicing stratégiát, hogy bővítse a vírus proteinek repertoárját. A különböző splicing alkalmazása más növényi vírusoknál és gazdasejt géneknél is gyakori szabályozó tényező (Kiss-László és mts., 1996)

II.7. Kölcsönhatás a geminivírus és a gazdasejt között

A geminivírusok replikációja és transzkripciója a gazdasejt replikációs és transzkripció mechanizmusaitól függ. Nagyon keveset tudunk arról, hogy milyen gazdasejt faktorok játszanak szerepet a vírus életsiklusában.

II.7.1. A geminivírus DNS replikációja és a gazdasejt közötti kapcsolat vizsgálata

A növényi sejt differenciálódása során elhagyja a sejtosztódási ciklust. A DNS replikációjáért felelős enzimek a terminálisan differenciálódott sejtekben már nem mutathatóak ki (Nagar és mts., 1995). A DNS replikációja és a sejtosztódás folyamata a csúcsmérsztémákban, a fejlődő levelekben és a kifejlett növények kambium sejtjeiben megy végbe (Staiger és mts., 1993). Egyes geminivírusok (répa hajtáscsúcs fodrozódást okozó vírusa (BCTV), vagy a tök levél fodrozódást okozó vírusa (SqLC)) esetében megfigyelhető, hogy a vírusfertőzés kizárólag a floem sejtekre korlátozódik (Sanderfoot és mts., 1996b). A vírus replikációja a prokambiális sejtekben megy végbe, amikor is a vírus felhasználja a gazdasejt már eleve meglévő rendszereit.

Más geminivírusok esetében a vírusfertőzés nem korlátozódik kizárólag a vaszkuláris szövetekre, hanem más növényi szövetben is kimutatható a replikálódó virális DNS. A TGMV részecskék például a differenciálódott dohány szár, levél és gyökér sejtek sejtmagjaiban is megtalálhatók (Nagar és mts., 1995). Az MSV DNS-e az érett kukorica levelek vaszkuláris szövetében és a mezofil sejtekben mutatható ki (Lucy és mts., 1996). Egyik vírus sem volt kimutatható a mérsztématikus sejtekben.

Ezeknek az eredményeknek az alapján fel kell tételeznünk, hogy a geminivírusok azáltal képesek replikálódni differenciálódott sejtekben, hogy indukálják a gazdasejt rendszereit. Ezt a feltételezést nagymértékben alátámasztja, hogy a proliferációs sejt nukleális antigén (PCNA) TGMV fertőzést követően felhalmozódott differenciálódott sejtekben (Nagar és mts., 1995), ugyanakkor az egészséges levelek hasonló sejtjeiben nem volt kimutatható. A PCNA a gazdasejt DNS polimeráz δ segítő faktora. A PCNA szintén kimutatható volt transzgenikus növények olyan differenciálódott sejtjeiben, amelyek expresszálták a Rep fehérjét. A gazdasejt indukciójához a Rep fehérje jelenléte elegendőnek bizonyult (Nagar és mts., 1995).

A geminivírusok az emlős DNS vírusoknak abból a szempontból az analógjai, hogy saját DNS-ük replikációjához a gazdasejt replikációs mechanizmusaira támaszkodnak. Az emlős DNS vírusok különböző mechanizmusokat használnak, hogy indukálják a gazdasejt replikációs fehérjeit. Az adenovírus E1A és a SV40 nagy T antigénje közvetlenül aktiválja a különböző gazdasejt gének transzkripcióját azáltal, hogy különböző transzkripció faktorokkal közvetlen kölcsönhatást létesít (Eckner és mts., 1996). A TGMV Rep fehérjeje az állati DNS vírusokhoz hasonlóan feltehetőleg képes közvetlenül aktiválni a PCNA transzkripcióját. Az a tény, hogy a TGMV Rep fehérjeje egy szekvencia függő DNS-kötő régiót tartalmaz (Fontes és mts., 1992), sőt transzkripció szabályozó képessége is van (Eagle és Hanley-Bowdoin, 1997), megerősíteni látszik ezt a feltételezést.

Az emlős vírus fehérjék más módon is képesek befolyásolni a gazdasejt szabályozó mechanizmusait, például úgy, hogy fehérje kölcsönhatást létesítenek különböző sejtciklust szabályozó fehérjékkel. Az SV40 nagy T antigénje, az adenovírus E1A és a emberi papillomavírus E7 fehérjeje kapcsolódik a retinoblasztóma fehérjéhez - pRb, p107 és p130 -, miáltal az E2F transzkripció faktor felszabadul (Hamel és mts., 1992). Ha az E2F felszabadul a gátlás alól, képessé válik arra, hogy különböző gének transzkripcióját indukálja, melyeknek azután a DNS replikációjában és a sejtciklus szabályozásában jut fontos szerep. A geminivírusok analízise azt mutatja, hogy valószínűleg ők is hasonló módon képesek befolyásolni a gazdasejtjeiket. Néhány geminivírus esetében bizonyítást nyert, hogy lehetetlen előállítani, olyan transzgenikus növényt, amely állandó magas szinten

szintetizálná a vírus Rep fehérjét. Ezek az eredmények jelzik, hogy a Rep fehérje a növény olyan alapvetően fontos élettani funkcióit befolyásolja, mint például a sejtciklus. Másodsorban megfigyelhető, hogy a TGMV fertőzés hatására a differenciálódott gazdasejt morfológiai változásokon megy keresztül (például a sejtmag vándorlása a sejt közepe felé (Nagar és mts., 1995). Ez a folyamat jelzi, hogy a Rep fehérje különböző dedifferenciálódási folyamatokat indukál. Egy másik fontos, a geminivírusok sejtciklust szabályozó szerepét alátámasztó megfigyelés az, hogy élesztő két-hibrid rendszerekben fehérje-fehérje kölcsönhatást lehet kimutatni, az MSV C1 fehérjéje, és a kukorica pRb homológ fehérje között (Horváth és mts., 1998). Izoláltak kukoricából különböző cDNS-eket, amelyek nagy mértékű homológiát mutattak az emlős pRb-hez (Grafí és mts., 1996; Xie és mts., 1996; Ach és mts., 1997). Jelenleg még nem ismert, hogy a kukorica pRb fehérjék működnek-e tumor-szupresszor fehérjeként, de néhány tulajdonságban megegyeznek az emlős pRb fehérjékkel. Tartalmazzák az A és a B zseb alegységeket, amelyek az emlős sejtekben fontos fehérje-fehérje kölcsönhatásokban vesznek részt (Wang és mts., 1994). A kukorica pRb kölcsönhat az SV40 nagy T antigénjével, a papillomavírus E7 és a növényi ciklin D az LXCXE motívumon keresztül (Grafí és mts., 1996, Ach és mts., 1997). Ez a motívum több olyan emlős fehérjében megtalálható, amelyek képesek kölcsönhatásba lépni az pRb-vel. Az MSV C1 fehérjén kívül a WDV hasonló fehérjénél és a TGMV Rep fehérjénél is kimutatták, hogy képes a humán pRb-hez kapcsolódni (Xie és mts., 1996; Collin és mts., 1996). Különbség tapasztalható a geminivírusok között abban az értelemben is, hogy a teljes hosszúságú Rep fehérje a WDV-nél és az MSV-nél nem hat kölcsön az pRb-vel, míg a TGMV Rep fehérjéje igen. A másik különbség, hogy a II-es a III-as csoportba tartozó vírusok Rep fehérjei nem tartalmazzák a konzervatív LXCXE motívumot, tehát ezeknél a vírusoknál feltételezhetően az pRb-hez való kötődés más motívumon keresztül történik meg.

Más geminivírus fehérjéknek is szerepük lehet a növényi sejt átprogramozásában. A BCTV fertőzés után, a szisztematikusan fertőzött levelek környékén hullámosodás tapasztalható. A levelek mikroszkópikus tanulmányozása azt mutatta, hogy a morfológiai változás a floem parenchima sejtek erőteljes osztódása

miatt alakulhatott ki (Esau és mts., 1978). A BCTV C4 fehérjében fellépő mutáció nem befolyásolta a vírus fertőzőképességét, de megakadályozta a levélfodrozódás kialakulását. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a C4 fehérje és a floem morfológiai változása között kapcsolat van. A C4 fehérjét túltermelő transzgenikus növények abnormális levélfejlődést és tumor képződést mutatnak. Ezért valószínű, hogy a C4 fehérje más virális fehérje jelenléte nélkül is képes sejtosztódást indukálni növényi sejtekben (Latham és mts., 1997).

Ha a geminivírusok képesek rákényszeríteni a sejteket, hogy újra visszalépjenek a sejtciklusba, és annak is az S fázisába, felmerül a kérdés, hogy mi történik a gazdasejt kromoszómáival. In situ hibridizációs analízisek azt mutatják, hogy a sejtmag felépítése a TGMV-vel fertőzött sejtekben megváltozik (Nagar és mts., nyomtatás alatt). A vírus DNS kisebb és nagyobb részecskékben a sejtmag közepén, a gazdasejt DNS-e pedig a sejtmag szélén helyezkedik el. Ez az elkülönülés magyarázhatja, hogy nagyon ritka esetben tapasztalható, hogy a vírus DNS-e beintegrálódjon a gazdasejt kromoszómáiba (Bejarano és mts., 1996). Néhány fertőzött sejtben a kromoszómális DNS kondenzálódása tapasztalható, ami feltételezi, hogy a kromoszómák nem replikálódnak intenzíven. Más esetekben azonban azt tapasztalták, hogy TGMV fertőzés után a PCNA, EF-4A, és a hiszton 2A promóterek indukálódnak (Egelkrout, Robertson, és Hanley-Bowdoin, nem publikált információ), ezért feltételezhetjük, hogy legalább néhány kromoszómális gén hozzáférhető a transzkripció rendszer számára. A brómdeuxiuridin (BrdU) beépülési kísérletek is azt mutatják, hogy a kromoszómális és a virális DNS is nagymértékben jelölődött a nukleotid analógok által. Ezek az eredmények pedig azt jelzik, hogy a vírusfertőzés hatására a gazdasejt DNS-e is replikálódott. Ezekből az eredményekből is látszik, hogy jelenleg nem teljesen tisztázott, hogy pontosan mi is játszódik le a gazdasejtekben geminivírus fertőzés hatására, de nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy a vírus módosítja a gazda sejtciklusát, eljuttatja egy S-fázis szerű állapotba, ahol végbe mehet a DNS replikációja.

II.7.2. A gazdasejt hatása a geminivírusok génexpressziójára

A geminivírus promóterek a transzkripció iniciációs hely előtt TATA-box szekvenciákat tartalmaznak, ami jelzi, hogy a vírus gének expressziójához a növény alap transzkripció apparátusára van szükség. A két komponensű vírusok komplementer promótere, amely a Rep fehérje transzkripciójáért felelős, tartalmaz G-box elemeket, amelyek fontosak a promóter aktivitásához (Eagle és Hanley-Bowdoin, 1997). A G-box elemek különböző növényi promóterekben is megtalálhatóak (Vetten és mts., 1994), és néhány növényi aktivátor fehérje specifikusan kapcsolódik hozzájuk. Ezeknek a fehérjéknek közös jellemvonása, hogy tartalmazzák a leucin zipper alegységet, ami elősegíti a fehérje dimerizálódását és DNS kötését. Ezenkívül általában tartalmaznak egy prolin gazdag szakaszt, ami a transzaktiválásért felelős. Elég sok G-box kötő fehérje ismert, de még nem tisztázott, hogy a geminivírus promótereikhez mely fehérjék kapcsolódnak.

A gazdasejt faktorai szintén képesek AL2-független aktivitást biztosítani a TGMV *AR1* génjének floem sejtekben (Sunter és Bisaro, 1997). Az a szekvencia, amely a floem specifikus expresszióért felelős, a transzkripció start hely előtt, a -163 és -107 nukleotidok között helyezkedik el, és nem foglalja magába a G-box kötő régiót, ami -200 körül található. A szövetspecifikus, negatív regulációban szerepet játszó szekvenciákat szintén meghatározták (Sunter és Bisaro, 1997). Pillanatnyilag nem ismert, hogy mely gazdasejt fehérjék felelősek a TGMV *AR1* gén működésének szabályozásáért. Fenoll és munkatársai (1988, 1990) kimutatták, hogy az MSV virion-szensz promótere szintén tartalmaz egy GC-gazdag elemet, ami nagyon fontos a promóter aktivitásához, és hogy ehhez a fehérjéhez *in vitro* specifikus növényi fehérjék kapcsolódnak.

A gazdasejt transzkripció faktorainak fontos szerepe lehet a geminivírus replikációban. A TGMV komplementer promótere és a vírus replikációs origója átfedő elhelyezkedésűek (2. ábra). A mutáció, amely érinti a TATA-boxot vagy a G-boxot, egyaránt gátolja a vírus replikációját és a komplementer promóter működését (Eagle és Hanley-Bowdoin, 1997). A G-box elemekhez kapcsolódó növényi fehérjék nagy érdeklődésre tarthatnak számot, mivel a növényi transzkripció faktorok körében ezek

az első példák, amelyek replikációs faktorként is működhetnek. Mind a transzkripció, mind a replikáció iniciációjához nagy fehérje komplexumoknak kell kialakulnia a DNS-en. A vírus replikációját elősegítő transzkripciós faktorok gyakran közvetlenül a replikációs iniciális fehérjével lépnek kölcsönhatásba. Ez a kölcsönhatás elősegítheti a replikációban szerepet játszó fehérjék stabilizálódását az iniciációs helyeken, esetleg aktivitásuk fokozódását. A marha papillómavírus kódol egy transzkripciós faktort (E2), amelyik kölcsönhat a vírus replikációs iniciációs fehérjével, és ezáltal elősegíti az alap replikációs aparátusnak a replikációs origóhoz való kapcsolódását (Li és Botchan, 1994). Az E2 fehérje aktiváló alegysége a nukleoszómák eltávolításával járul hozzá a replikáció elősegítéséhez. Egy másik példa az emlős transzkripciós faktor NF1 kölcsönhatása az adenovírus DNS polimerázával, ami a preiniciációs komplexet az origón stabilizálja (Mul és mts., 1992). A c-Jun és a c-Fos kölcsönhat az SV40 nagy T antigénjével, és erősíti annak helikáz aktivitását (Ito és mts., 1996). Ehhez hasonlóan a G-box fehérjék hozzájárulhatnak a geminivírusok replikációjához oly módon, hogy elősegítik a Rep vagy más létfontosságú fehérjék kapcsolódását a replikációs origóhoz, esetleg megnövelik a Rep katalitikus aktivitását, vagy megváltoztatják az origó struktúráját.

A geminivírusok hatással vannak a gazdasejt génjeinek az expressziójára. A TGMV-nek ill. a TGMV Rep fehérjéjének az a képessége, hogy aktiválni képes a PCNA promóterét (Egelkrout, Robertson, és Hanley-Bowdoin, személyes közlés), az első példa arra, hogy egy növényi vírus replikációs fehérjeje transzkripciós szabályozó szereppel is rendelkezhet. A geminivírus fertőzés okozhatja egyes gazdasejt gének represszióját (Kjemtrup és mts., 1998). A TGMV-alapú episzóma, amely a növényi magnézium keletáz egyik alegységét tartalmazza, gátolta az endogén gén működését. A magnézium keletáz a klorofill szintézisében játszik szerepet. A fertőzött növények levelén sárga és világoszöld foltok láthatóak, ahol hiányzott a normális klorofill. Hasonlóan, abban az esetben, ha a TGMV-alapú episzóma tartalmazta a luciferáz génjét, fertőzés után az endogén luciferáz működése gátolt volt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a klorofill szintézis gátlása feltételezhetően nem a vírus tulajdonságainak, hanem inkább a gén "elhallgattatás" jelenségének köszönhető.

A gén "elhallgattatás" jelensége legjobban az RNS vírusok esetében tanulmányozott. A geminivírus által létrehozott gén "elhallgattatás" mechanizmusa nem ismert, de feltételezhetően magába foglal transzkripció, és poszttranszkripció folyamatokat is.

III. Célkitűzés

Munkánk során tanulmányoztuk, hogy az MSV esetében milyen mértékű a kapcsolat a vírus életsiklusa és a gazdasejt sejtciklusa között. Kísérleteink segítségével az alábbi kérdésre kerestünk választ:

1. A potenciális virális promóter régiók működőképesek-e transzgenikus kukorica növények gyökereiben és sejtszuszpenziókban?
2. A 2,4-D befolyásolja-e a virális promóterek expresszióját?
3. A virális promóterek a sejtciklus szabályozása alatt állnak-e?
4. A virális fehérjék hatással vannak-e a promóterek aktivitására?
5. Létezik-e fehérje-fehérje kölcsönhatás a C1C2 replikációs fehérje és a kukorica sejtciklusát szabályozó fehérjék között?

IV. Anyagok és módszerek

IV. 1 Szövettenyésztés

IV. 1. 1. Növényi anyagok és a sejt kultúra fenntartása

A munkánkhoz a He/89 (Ke2/2) kukorica sejt kultúrát használtuk fel. A sejt szuszpenzió tenyésztése N6M tápoldatban történt (Mórocz és mts., 1990). Az auxintartalmat 1mg/l koncentrációra emeltük meg, hogy finomabb sejt szuszpenzió álljon rendelkezésünkre. A sejt szuszpenziót 8g/l koncentrációban, 120 rpm rázatással, 23 °C-on, 8/16 óra fotoperiódussal tartottuk fenn a szinkronizálási kísérletekhez. A transzformálásokhoz hasonló sűrűségű, de ritkábban átpasszált (10-16 nap) sejt kultúrákat használtunk. A sejteket szilárd táptalajon is fenntartottuk (N6M), ahol magasabb szacharóz mennyiség mellett (6%) egy- két hónapig is életképesek voltak a sejtek.

IV. 1.2. Protoplaszt transzformáció és növény regenerálás

Kukorica sejt szuszpenzióból protoplasztokat izoláltunk és a protoplasztokat polietilénglikol (PEG) segítségével transzformáltuk (Omirulleh és mts., 1993). A kukorica sejt szuszpenziót három nappal az átpasszálás után sejt falemészítő oldattal (2% Celluláz RS és 0,2% pektoláz Y23 MaCa oldatban (3,64% mannitól, 1,17% CaCl₂ és 0,2% MES)) kezeltük egy éjszakán át. Mivel a kukorica szuszpenzió elég nagy számú sejtegyüttesből áll, a protoplasztok hatékonyabb felszabadulása érdekében, az inkubálás után a sejt szuszpenziót egy óra hosszáig 50 rpm sebességgel ráztuk. Következő lépésként a protoplasztokat leszűrtük (100-50µm), majd szacharóz gradiensen centrifugáltuk őket, hogy az életképes protoplasztokat elkülöníthessük a sejt törmeléktől. Rövid protoplasztálást (1h) végeztünk a szinkronizálási kísérletek során, sejt mag izolálás céljából.

A növényi transzformációs kísérletek során, két héttel a DNS bejuttatása után 0,5 ml friss N6M tápoldatot adtunk a sejt kultúrához, majd fokozatosan hígítottuk a

kultúrát N6M tápoldattal. A négyhetes mikrokolóniákat gelrit (0.2 %) tartalmú szilárd N6M táptalajra helyeztük. Ezek a táptalajok 100mg/l kanamycint is tartalmaztak szelekció céljából. A szelektív táptalajon felnőtt kalluszokat növény regeneráltatás céljából hormonmentes N6M szilárd táptalajra helyeztük. A hormonmentes táptalajon a növény regenerálásra hónapokkal a transzformálás után kerül sor.

A kukorica gyökerek 2,4-dichlorofenoxiecetsav (2,4-D) kezelése szilárd N6M táptalajon történt. A 2,4-D-t két különböző koncentrációban (egy alacsonyabb (0,2 mg/l) és egy magasabb (1 mg/l)), alkalmaztuk 3 napon keresztül. A kezelés után a gyökereket hisztokémiai festéssel analizáltuk.

IV. 1. 3. Sejtszinkronizálás

Exponenciális növekedési állapotban lévő sejtszuszpenzióból 16 grammot 200ml N6M tápoldatba helyeztünk (kiegészítve 2,4-D-vel (1mg/l)). Három napon (72 óra) át fenntartottuk az előző fejezetekben említett körülmények között, majd hozzáadtuk a blokkoló anyagot (hidroxiurea (HU) 5mM koncentrációban). A HU törzsoldatot mindig frissen készítettük és filter sterilizálva adtuk hozzá a sejt kultúrához. A HU-val a kezelés 36 órán át tartott. Két-három órával a blokkoló anyag eltávolítása előtt elkezdtük összegyűjteni a kondicionáló oldatot, a párhuzamosan fenntartott szuszpenziókból (lásd később). A sejteket 50 μ m-es szűrőn intenzíven mostuk 5-10-szer annyi tápoldattal, mint a sejt kultúra eredeti térfogata volt. Megközelítőleg 1 liter kondicionáló tápoldatot használtunk fel a sejt felületi HU eltávolításához, miközben a sejteket a szűrőn tartottuk. A továbbiakban ötször mostuk a sejteket oly módon, hogy hagytuk pár percre leülepedni őket, majd eltávolítottuk a sejtmentes tápoldatot, amit tiszta kondicionálóval helyettesítettünk. Minden egyes alkalommal, amikor a sejtek friss kondicionálót kaptak, 20 percre ráztuk őket. Az utolsó mosás után a sejteket 1:2 arányú kondicionáló:friss tápoldatba tettük. A szinkron nyomon követése a mitotikus index és a sejtmagok DNS tartalmának az ellenőrzésén keresztül történt, (mosás előtt, közvetlenül a mosás után és egy napon keresztül 3 óránként). Minden mintavételnél Minden mintavételnél 100-200 mg sejtet RNS izolálásra használtunk fel.



IV. 1. 4. Kondicionáló tápoldat előállítása

A kondicionáló oldatot szűréssel állítottuk elő azokból a szuszpenziókból, amelyeket a szinkronizáláshoz felhasznált sejt kultúrával párhuzamosan készítettünk. A kalluszkutat 200, 100, 50 és 25 µm-os szűrőn szűrtük le. A kondicionáló oldatot összegyűjtöttük és szobahőmérsékleten tartottuk a felhasználásig (2-3 óra).

IV. 2. Molekuláris biológiai és biokémiai technológiák

IV. 2. 1. Baktériumos tápoldatok, törzsek és vektorok

A baktériumok számára az antibiotikus tápoldatot Sambrook és munkatársai (1989) által leírt módon készítettük el. Baktérium törzsek közül a *Escherichia coli*-t (DH5α) használtuk. Kompetens sejteket, amire a plazmid DNS felszaporítása érdekében volt szükségünk, Inoue és munkatársai (1990) módszerével készítettük el.

A növényi transzformálásra felhasznált konstrukciók alapja a pMB105 plazmid volt, amely tartalmazta a MSV Nigériai (MSV-Ns) faj teljes genomját pUC19 vektorban (Boulton MI és mts., 1991). A további konstrukciók készítéséhez szükséges vírus szekvenciákat PCR-rel állítottuk elő erről a vektorról.

A konstrukciók, amelyeket transzgenikus növények előállítására használtunk fel, a pLP100 promóter tesztelő vektoron alapultak (Szczyglowski és mts., 1994). A burokfehérje promóterének vizsgálatát a prBF nevű konstrukcióval végeztük el, ami tartalmazta a vírus burokfehérje promóterét fúzionáltatva a β-Glükoronidáz riportergénnel. PCR primert terveztünk a vírus 2379 bp pozíciójában, ami *EcoR* I túlnyúló véget tartalmazott (5'-CGGAATTC-GACGACGGAGGTTGAG-3') és a vírus 310 bp pozíciójában, ami ebben az esetben *Hind* III túlnyúló véget tartalmazott. (5'-CGAAGCTT-GAATGCTTATCCCGTG-3'). A PCR fragmenteket *EcoR* I-*Hind* III-

helyre raktuk be a pBluescript (pBS+, Stratagene) vektorba, innen pedig ugyanezt a DNS szakaszt a pLP100 *EcoRI-Hind III* helyére építettük be.

A replikációs fehérje promóterének analízisét két különböző konstrukcióval végeztük el. Az egyik (prREPK) a már említett prBF konstrukcióban használt promóter szakaszt tartalmazta fordított orientációban. A másik konstrukció amivel a replikációs fehérje aktivitását vizsgáltuk a prREPN volt. Erre a konstrukcióra PCR primert terveztünk a vírus 1661bp pozíciójában. Ez a primer szintén *EcoR I* túlnyúló véget tartalmazott (5'-GCGAATTC-ATGGATGGATTCTGTATC-3'). A PCR terméket a pBS+ vektor *EcoR I* helyére építettük, majd innen került a fragment a pLP100-as vektor *EcoR I* helyére.

A vírusfehérjék túltermeltetéséhez használt konstrukciók a pAHC25 vektoron alapultak. A különböző konstrukciók esetében különböző (C1, C2, C1C2, V2) vírus fehérjéket építettünk be a GUS riportergén helyére. A vírus fehérjék kódoló régióját PCR amplifikációval hoztuk létre. Az C1 fehérje 5' végi (5'-GAATTC-ATGGCCTCCTCCTCATCC-3'), és a 3' végi primere (5'-GTCGAC-CTAGGCTTCTGGCCCAAG-3') volt. A C2 fehérje 5'-végi (5'- GCGAATTC-ATGGATGGATTCTGTATC-3'), és a 3' primere (5'-GTCGAC-TCAAAGATCTATCTGAATG-3') volt. A C1C2 fehérje felamplifikálásához a C1 5'-végi és a C2 3'-végi primerét használtuk a pMB1635 vektoron, ami az MSV-Ns egy olyan genomját tartalmazta, amiben nincs jelen a komplementer szál intronja. A V2 fehérje 5'-végi (5'-GCGAATTC-ATGTCCACGTCCAAGAGG-3'), és a 3'-végi primere (5'-CGGTGAC-CTGGTTGCCAACACTCTT-3') volt. Az 5'-végi primer mind a négy vírusfehérje felamplifikálása esetében tartalmaz túlnyúló *EcoR I* restrikciós helyet, a 3'-végi primer pedig a *Sal I* túlnyúló restrikciós helyet. A PCR termékeket minden esetben beklonoztunk a pBS+ vektorba ellenőrzésképpen és megszekvenáltattuk. A különböző vírusfehérjéket *Sal I* enzimmal vágtuk ki, majd Klenow-polimerázzal töltöttük fel. *EcoR I*-vel vágtuk meg a gén másik oldalát és beligáltuk a pAHC25 vektorba *Cfr 91-Ecl 136II* helyre.

Az élesztősejtek transzformálásához két különböző konstrukciót használtunk. Az egyik konstrukció a pGBT9 élesztő két-hibrid vektoron (Clontech) alapul. Beépítettük a vektor *EcoR I-Sal I* helyére az előző bekezdésben említett C1C2

fehérje cDNS-ét. A másik vektorba (pGAD424) pedig a kukorica embriogén szuszpenzióból származó cDNS génkönyvtár szekvenciáit.

IV. 2. 2. Plazmid DNS izolálás

A plazmid DNS izolálás, attól függően, hogy mennyi DNS-re volt szükség (mini és maxi preparálás) Sambrook és munkatársai (1989) módszerei alapján készültek.

IV. 2. 3. Emésztés restrikciós enzimekkel

Az enzimatis reakciókat a gyártócég (New England Biolabs, Boehringer, Fermentas) javaslatai alapján végeztük el. A genomikus DNS emésztését általában egy éjszakán át inkubáltuk a megfelelő pufferben, amit 5 mg/ml BSA-val (marha vészérum albumin) egészítettük ki. Az emésztett DNS-t fenol/kloroformmal tisztítottuk, majd kicsaptuk. Lecentrifugáltuk és kis mennyiségű minta pufferben felfuszpendáltuk, végül a felhasználás előtt 5 percig 65 °C-on inkubáltuk.

IV. 2. 4. A nukleinsavak elektroforézise

A nukleinsavak frakcionálását Sambrook és munkatársai (1989) javaslatai alapján hajtottuk végre. A frakcionálást az elválasztás céljától függően különböző koncentrációjú agaróz gélben és a megfelelő pufferben végeztük el. A restrikciós fragmenteket 1%-os TBE-agaróz gélben futattuk meg és UV fény segítségével tettük láthatóvá olyan gélekben, amelyek 0,5 µg/ml EtBr-ot tartalmaztak. A PCR fragmenteket 1-2%-os TBE-agaróz gélben futattuk meg.

IV. 2. 5. PCR amplifikáció

A DNS amplifikációt az alap protokollban szereplő módon végeztük el. A PCR primerek automata oligó szintetizátorral készültek. A primereket 1 nmol/µl

koncentrációban steril vízben oldottuk fel. A PCR fragmenteket agaróz gélben futattuk meg, ahonnan üveggyönggy (Amersham) segítségével izoláltuk. Az izolált PCR fragmenteket pBS+ vektorba építettük be és megszekvenáltattuk automata szekvenátorral.

IV. 2. 6. Össz-RNS analízis és *Northern* hibridizáció

Az össz-RNS izolálásra Chomzynski és Sacchi (1987) módszerét alkalmaztuk. Az össz-RNS-t denaturáló formaldehid tartalmú gélben frakcionáltuk és Hybond N+ membránhoz rögzítettük. Az RNS-t UV fény segítségével keresztkötöttük a membránra és a filtereket a felhasználás idejéig -20 °C-on tároltuk. A hibridizáláshoz felhasznált próbákat random primerek segítségével ³²P jelenlétében hoztuk létre. A jelöléshez felhasznált DNS-ek a gének teljes hosszúságú kódolószakaszát tartalmazták a BF, a GUS, a CycB1 és a H4Zm esetében (Philipps és mts., 1986; Renaudin és mts., 1996). A hibridizálást a Sambrook és munkatársai (1989) által leírt módszerek alapján végeztük el, a filterek mosása pedig foszfát pufferrel (65 °C, 3 x 20 perc) történt (Chomzynski és Sacchi, 1987).

IV. 3. Sejtbiológiai technológiák

IV. 3. 1. Mitotikus index analízise

Néhány ezer sejtet 1 órát szobahőmérsékleten fixáltunk PBS pufferben, amely 8% formaldehidet és 0,1% Triton-X-100-at is tartalmazott. A további felhasználásig (1-2 nap) 4 °C tároltuk őket. Hosszabb távú tárolás esetén (néhány hét-hónap) a fixálót eltávolítottuk és a növényi mintákat 70%-os alkoholban tároltuk. A fixálót fokozatosan távolítottuk el PBS pufferrel, végül ebben a pufferben hagytuk a sejteket. A sejteket tárgylemezre helyeztük és a sejtmagokat 5 µg/µl koncentrációjú DAPI-val (4,6-diamino-2-fenilindol HCl) festettük. 800-1000 sejtet analizálunk és a meta-, ana- és telofázisos sejteket megszámoltuk.

IV. 3. 2. Sejtmag izolálás áramlásos citológiai méréshez

A sejtmag izoláláshoz Galbraith módszerét (Galbraith és mts., 1983) használtuk. Körülbelül egy teljes Pasteur pipettányi sejtet a szuszpenzióból sejtfalemészto enzim eleggyel (2% Celluláz RS és 0,2% pektoliáz Y23 MaCa oldatban (3,64% mannitól, 1,17% CaCl_2 és 0,2% MES)) (3-9 ml) inkubáltuk a protoplaszt izolálásnál említett módon. Az elegyet asztali rázógépen 50 rpm-el ráztuk 1 órán keresztül. Szobahőmérsékleten 1 óra elegendő időnek bizonyult, hogy megfelelő mennyiségű protoplasztot kapjunk. A protoplasztokat átszűrtük egy 50 μm -os szűrőn, mostuk és felfuszpendáltuk MaCa oldatban. A szükséges centrifugálás 1000 rpm-el 10 percig történt. A MaCa oldat eltávolítása után a protoplasztokat jégre helyeztük és 4 ml 4 °C-os Galbraith puffert (Galbraith és mts., 1983) adtunk hozzájuk. A protoplasztokat gyengéden felfuszpendáltuk és 5 percig inkubáltuk 10 ml-es csövekben, jégen, vízszintes helyzetben. A sejteket a következőkben pipettázással tártuk fel. Körülbelül 235 μl 37%-os formaldehidet (Sigma) adtunk az elegyhez (8% végkoncentrációban). Következő lépésként a sejtmagokat átszűrtük egy 25 μm -os szűrőn és az áramlásos citológiai mérésekig 4 °C-on függőleges helyzetben tártuk őket. Így a sejtmagok a gravitáció miatt lassan összegyűltek a csövek alján. A legjobb eredményt akkor értük el, amikor az izolálást követő napon mértünk. A mérés előtt a sejtmagokat 10 μm -os szűrőn szűrtük át és a sejtmagokat propidium-jodiddal (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) festettük meg. A Becton Dickinson *FacsCalibur flow cytometer*-en egy méréshez 10 000-20 000 sejtmagra van szükség.

IV. 3. 3. Hisztokémiai GUS aktivitás

A transzgenikus kukorica növények gyökereit Beeckman és munkatársai (1994) által kidolgozott módszerrel analizáltuk. A friss növényi gyökereket az X-Gluc (5-bromo-4kloro-3-indolil- β -glükoronid) tartalmú festékben (100 mM NaH_2PO_4 (pH:7,0) 1 mg/ml X-Gluc, 10 mM 2-merkaptotanol) 37 °C-on egy éjszakán át

inkubáltuk. Utána a szövetet, laktofenol oldattal (tejsav, fenol, klorál-hidrát (1:1:2)) tisztítottuk meg, egy napon keresztül 4 °C-on. A gyökerek hosszútávú tárolása laktofenol oldatban történt.

IV. 3. 4. Fluorimetrikus GUS aktivitás mérés

GUS aktivitás kvantitatív kimutatására Jefferson és munkatársai (1987) módszerét alkalmaztuk. Az analízishez felhasznált szubsztrát a 4-metilumbelliferil- β -D-glükoronid (MUG). A kukorica kalluszok felületéről papírzsebkendővel eltávolítottuk a nedvességet, majd hozzáadtuk a lízis puffert és dörzsöléssel, kvarchomok hozzáadásával feltártuk a sejteket. 5 perces centrifugálás következett, 10 000 rpm-en, majd a felülúszót inkubáltuk a MUG-ot tartalmazó oldattal. A reakció leállítása 0,2 M Na₂CO₃-tal történt. A fluoreszcenciát a TK100 Mini-Fluorimeterrel (Hoefer) mértük meg és összehasonlítottuk a különböző koncentrációjú a 4-metilumbelliferon oldatokéval. A sejtextraktumok fehérje koncentrációját Bradford reagenssel (BioRad) mértük.

IV. 3. 5. BrdU jelölés

A kukorica növény gyökereit N6M táptalajról 10 mM BrdU-t tartalmazó N6M tápoldatba helyeztük és 16 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A kezelés után 1 órán át fixáltuk a gyökereket formaldehiddel (4%) és Triton-X-100-zal (0,1%) kiegészített PBS oldatban. A gyökereket háromszor 10 percig PBS pufferrel mostuk, majd 15 percig a növényi transzformálásnál említett sejtfalemésztő enzimmal, részleges sejtfalemésztést végeztünk. Az enzimet háromszor 10 perces mosással távolítottuk el. Ezután a gyökereket inkubáltuk a BrdU elleni egér monoklonális antitesttel (Amersham) 1 órán át 37 °C-on. Következő lépésként a fluoreszcein izotiocianát (FITC)-konjugált második antitesttel (egér elleni kecske IgG: Biosource Camarillo, Calif, U.S.A) inkubáltuk a mintákat, 1 órán át 37 °C-on. Végül DAPI-val festettük meg a gyökereket. A fluoreszcenciát fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk.

IV. 3. 6. Élesztő két-hibrid analízis

Transzformálásra a HF7c (MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 URA3::GAL4(17-darabos)₃-CYC1_{TATA}-lacZ) (Feilotter és mts., 1994) élesztő törzset használtuk, amely két riportergént, HIS3-at és lacZ-t is tartalmaz. A transzformálás a pGBT9 és a pGAD424 vektorral (Schiestl és Gietz, 1989) történt. A GAL4 DNS-kötő-C1C2 fúziós fehérje kimutatása céljából az élesztő sejteket 25ml SD tápoldatban növesztettük, amely Trp kivételével az összes aminosavat és 2% etanolt tartalmazott. Asztali centrifugában 4000g-vel 10 percig centrifugáltuk és a csapadékot lízis pufferben vettük fel (50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,1% SDS, 0,02% NaN₃, 0,5 mM fenilmetil szulfonil fluorid) 1,2x10⁹ sejt milliliterenként. A mintákat azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, majd felengedtük őket 37°C-on. Ezt háromszor megismételtük. A mintákat összekevertük 5x SDS-PAGE (50% glicerol, 10% SDS, 0,5M DTT, 0,25M Tris-HCl pH6,8, 0,2% brómfenol kék) mintapufferrel és 10 percig forraltuk. A transzgén jelenlétét immunodetektlálással mutattuk ki. Első antitestként a GAL4 DNS-kötő régió elleni monoklonális egér antitestet használtunk (RK5C1, 1:3000 hígításban, Santa Cruz Biotechnology, sc-510). Második antitestként egér elleni polivalens immunoglobulint alkalmaztunk, amely peroxidáz konjugátumot tartalmazott (1:350 hígításban, Sigma, A-0412).

A transzformációs keveréket a transzformációs hatékonyság ellenőrzésére szilárd táptalajra szélesztettük ki, amely nem tartalmazott leucint és triptofánt (SD-Trp-Leu). Kiszélesztettük ezenkívül olyan táptalajra is, amely nem tartalmazott leucint, triptofánt, hisztidint és amelyet a fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatására 20mM 3-amino-1,2,4-triazollal (SD-Trp-Leu-His+3-AT) kiegészítettük. A pozitív kolóniák a transzformálás után 4-6 nappal jelentek meg a szelektív lemezen. A pozitív élesztő kolóniákból DNS-t izoláltunk, amit visszatranszformáltunk *Escherichia coli* sejtekbe, hogy tiszta plazmid DNS álljon rendelkezésünkre a szekvenáláshoz.

Azért, hogy megerősíthessük, hogy a fúziós fehérjék között fehérje-fehérje kölcsönhatás létezik, a pozitív élesztő klonokat X-gal-on (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-

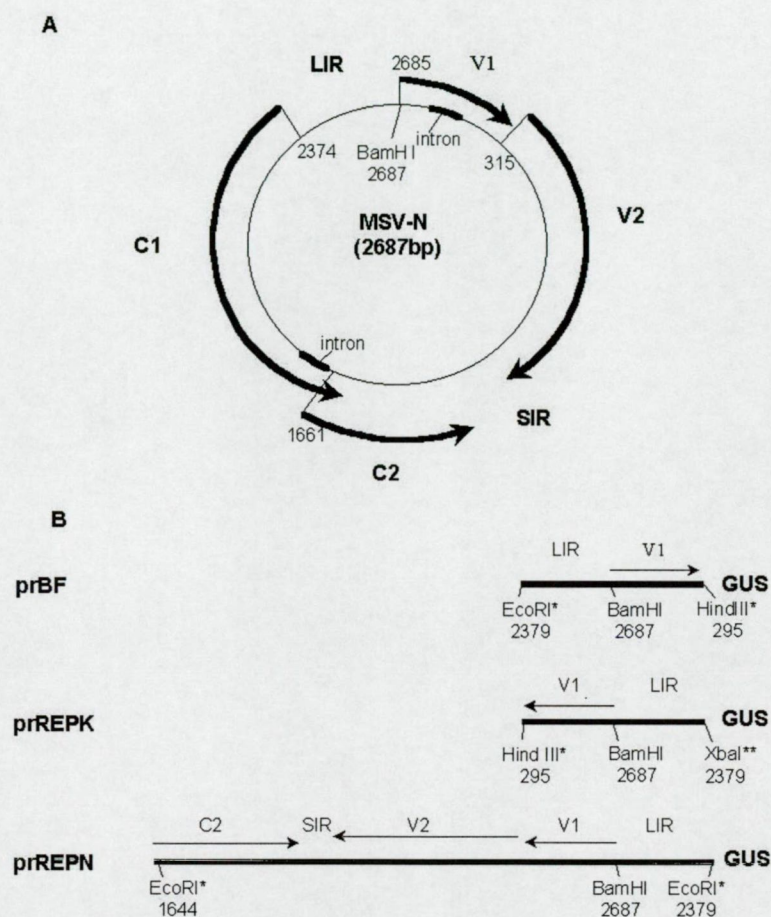
D-galaktopiranozid) alapuló β -galaktozidáz eljárással mutattuk ki (Bartel és mts., 1993).

V. Eredmények

V.1. A virális promóterek aktivitása kukorica protoplasztokban és transzgenikus kalluszokban

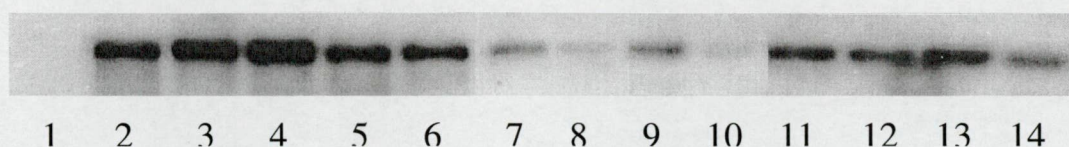
Munkánk során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy transzgenikus kukorica növények gyökereiben és sejtszuszpenzióiban az MSV potenciális promóter régiói működőképesek-e a virális fehérjék jelenléte nélkül. Mórocz és munkatársai (1990) létrehozta egy kukorica sejt vonalat, ami alkalmasnak bizonyult transzgenikus növények előállítására. A kukorica kalluszok hosszú ideig tartó fenntartása folyékony tápoldatban (hormonnal kiegészítve) finom sejt kultúrát eredményezett. A növényi transzformálásokhoz ebből a sejt kultúrából protoplasztokat állítottunk elő. A transzformálás után kanamycint tartalmazó szilárd táptalajon szelektáltunk a pozitív klonokra.

Transzgenikus kukorica vonalakat hoztunk létre, amelyek az MSV különböző promótereit tartalmazta fúzionáltatva a β -glükoronidáz riportergénnel (3.ábra). Transzformálásra három különböző konstrukciót készítettünk, mindegyik a pLP100 promóter tesztelő vektoron alapult. A transzformálásra felhasznált konstrukciók vázlatos képén látható, hogy a prBF konstrukció tartalmazza a vírus burokfehérje promóterét. A promóter szakasz alatt jelen esetben a nagy intergenikus szakaszt (LIR) és a burokfehérje transzlációs iniciációs triplette előtti 5' DNS szakaszt értjük. Annak ellenére, hogy ebben a promóter szakaszban megtalálható a V1-es fehérje teljes nyitott leolvasási kerete, a V1-es fehérje génjének szekvenciája is fontos a burokfehérje promóterének vizsgálatánál, mivel a mutációs eredmények azt mutatják, hogy a burokfehérje működéséhez fontos szekvencia elemek találhatóak ebben a gén szakaszban (Fenoll és mts., 1988). A prREPK konstrukciót tartalmazó kukorica vonalak a replikációs fehérje promóterét tartalmazzák, mégpedig egy rövidebb (618bp) szakaszt, ami a C1 replikációs fehérje transzlációs iniciációs triplette előtt helyezkedik el. Ez a promóter szakasz a LIR-ből és a V1 fehérje nyitott leolvasási keretéből áll, ami teljes mértékben megegyezik a prBF konstrukcióban használt promóterrel, csak fordított orientációban helyezkedik el. A prREPN konstrukciót



3. ábra. Az MSV nigériai alfajához tartozó vírus vázlatos felépítése (A) és a transzformálásra felhasznált expressziós vektorok vázlatos képe (B) látható. Mindhárom konstrukció a pLP100 promóter tesztelő vektoron alapult. Az alapvektor tartalmazta a β -glükuronidáz (GUS) riportergént, amelyet a nopalín szintáz poliadenilációs helye (pAnos) követ. A prBF konstrukció és a prREPK tartalmaz egy 618 bp-os, a prREPN ~1969 bp-os szakaszt a vírus DNS-ből. A vírus DNS-t PCR-vel amplifikáltuk fel és megfelelő restrikciós helyekre ligáltuk a vektor polilinker régiójába, ami a GUS el őtt helyezkedett el.

tartalmazó kalluszok segítségével szintén a replikációs fehérje promóterének aktivitását vizsgáltuk de ez a promóter szakasz lényegesen hosszabb volt (1969bp), és magába foglalta a prREPK konstrukcióban is megtalálható LIR a V1 fehérje génjét, a burokfehérjét, a kis intergenikus szakaszt (SIR) és a C2 fehérje génjét is. Tulajdonképpen a C1-es fehérje kivételével a teljes vírus genom megtalálható a GUS riporter gén előtt. Ezt a konstrukciót azért hoztuk létre, mivel feltételeztük, hogy a LIR szakaszon kívül is vannak olyan DNS szekvenciák, amelyek hatással lehetnek a replikációs fehérje aktivitására.



4. ábra. A kanamycin rezisztens klonok *Northern* hibridizációs eredményei. 1-negatív kontroll (He/89); 2-6 (prBF (a, d, h, f, g)); 7-10 (prREPK (12, 16, 22, 30)); 11-14 (prREPN (7, 8, 10, 13)). A jelöléshez felhasznált DNS, a GUS gén teljes hosszúságú kódolószakaszát tartalmazta.

A szelektív táptalajon felnőtt kalluszokat *Southern* (az adatokat nem mutatjuk) és *Northern* hibridizációval analizáltuk (4. ábra). A pozitív klonokból szuszpenziós sejt kultúrát készítettünk és a sejtek exponenciális növekedési stádiumában ezen vizsgáltuk a különböző vírus promótereket tartalmazó konstrukciók aktivitását. Az eredmények az 1. táblázatban láthatóak. A független transzformáns kallusz vonalakban passzálás után három nappal mértük a GUS aktivitást. Legmagasabb GUS aktivitást prBF konstrukciót tartalmazó kalluszok esetében tapasztaltunk ennek kb. a felét a prREPK kalluszok esetében és a prREPN-es kalluszok GUS értékei megközelítették a burokfehérje promóterét tartalmazó kalluszokban mért értékeket. Az öregedő, prREPK és a prREPN kalluszok GUS aktivitása lecsökken a mérhetőségi határ alá, ugyanakkor a prBF klonok esetében még ezekben a sejtekben is mérhető a GUS aktivitás, bár csak az osztódó sejtekben tapasztalt érték harmadát-negyedét éri el.

| Minták | GUS aktivitás (pmol MU/mg prot./h) | Átlagok és standard hiba |
|-----------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Kontroll | 125,0 | |
| CaMV 35S promóter-GUS | 500,0 | |
| prBF a | 1170,0 | 1113,5 ± 227,8 |
| prBF d | 1215,6 | |
| prBF h | 1410,0 | |
| prBF f | 848,1 | |
| prBF g | 923,8 | |
| prREPK 12 | 282,5 | 539,4 ± 202,0 |
| prREPK 16 | 518,1 | |
| prREPK 22 | 771,9 | |
| prREPK 30 | 585,0 | |
| prREPN 7 | 818,1 | 857,0 ± 132,4 |
| prREPN 8 | 698,7 | |
| prREPN 10 | 1013,0 | |
| prREPN 13 | 898,1 | |

1. Táblázat. GUS aktivitás a különböző transzgenikus kukorica kallusokban. Sejtszuszpenziót a különböző transzgenikus kallusokból indítottunk. A méréshez a növekedés logaritmikus fázisából vettünk mintát. A különböző vonalak a különböző vírus promótereket tartalmazták a GUS előtt. He/89-negatív kontroll, CaMV 35S promóter-GUS a pozitív kontroll.

A virális promóterek működését tranziens kísérletek segítségével is analizáltuk. Kukorica protoplasztokat készítettünk, amelyeket a három különböző konstrukcióval transzformáltuk. A transzformálás után két és három nappal mintát vettünk és GUS aktivitást mértünk a különböző mintákból. A GUS aktivitás értékei a 2. Táblázatban láthatók. A prBF konstrukcióval transzformált kukoricasejtek erős GUS aktivitást mutattak két és három nappal a transzformálás után. Ezzel ellentétben a prREPK és a prREPN-el történt transzformálás után sem két, sem három nappal nem tapasztaltunk mérhető GUS aktivitást.

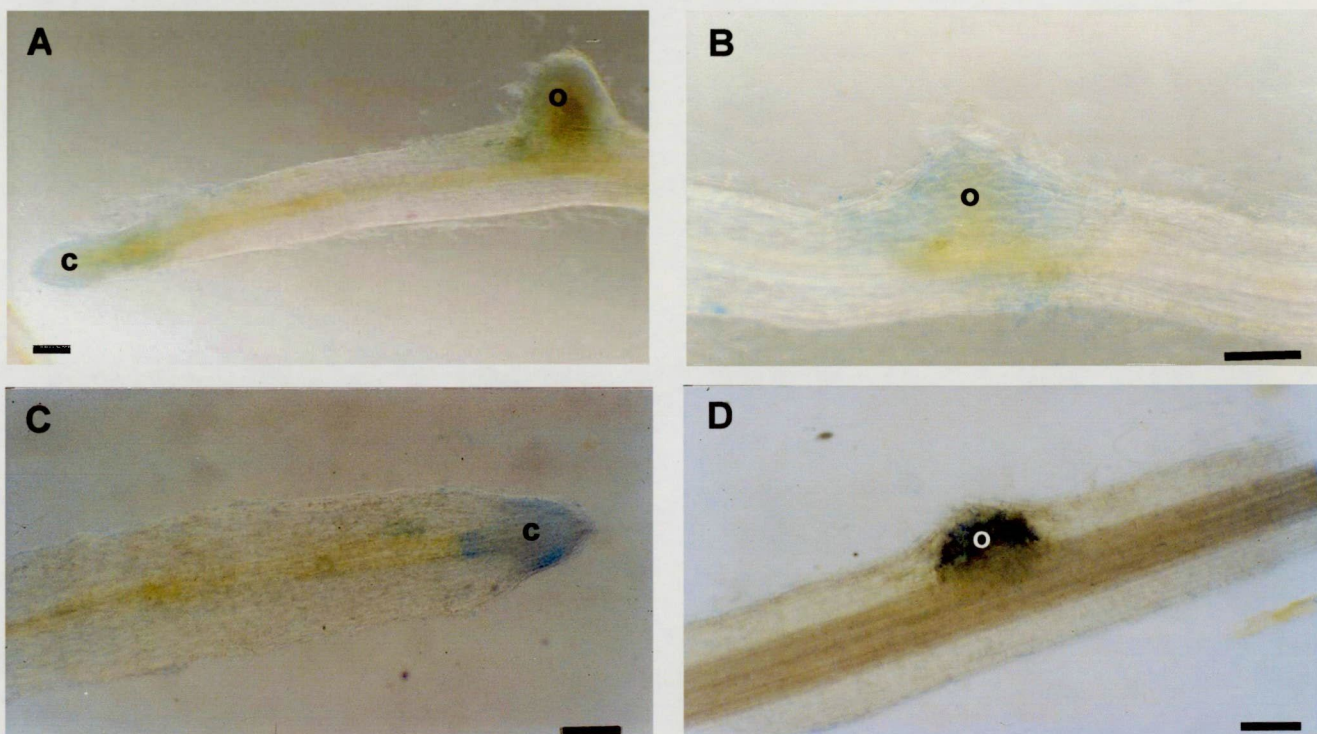
| Minták | GUS aktivitás (pmól MU/mg prot./h) | Átlagok és standard hiba |
|----------|------------------------------------|--------------------------|
| prBF | 514,5 | 533,7 ± 87,2 |
| prBF | 653,7 | |
| prBF | 493,0 | |
| prREPK | 62,0 | 47,8 ± 16,8 |
| prREPK | 29,8 | |
| prREPK | 54,4 | |
| prREPN | 63,0 | 53,1 ± 13,0 |
| prREPN | 38,4 | |
| prREPN | 58,0 | |
| Kontroll | 69,0 | |

2. Táblázat Kukorica kalluszekben mért GUS aktivitás értékek 3 nappal a transzformálás után. Transzformálásra a 3 különböző konstrukciót használtuk fel (prBF, prREPK és a prREPN).

V.2. A virális promóterek aktivitása transzgenikus növények gyökereiben

A transzformálás és szelektálás után a kalluszeket növény regeneráltatás céljából az „Anyagok és módszerek” fejezetben említett módon hormonmentes táptalajra helyeztük. A transzgenikus kukorica növények gyökereit, amelyek tartalmazták a prREPK és prREPN konstrukciókat hisztokémiai GUS festéssel analizáltuk (5.ábra). Festődést a gyökércsúcsban és az oldalgyökér kezdeményekben tapasztaltunk. A fiatalabb gyökerek csúcsában erőteljesebb festődést tapasztaltunk, mint az öregebb gyökerekben. Tehát mindkét promóter működéséről elmondhatjuk, hogy sejtosztódás specifikusak, vagyis a gyökér osztódó szöveteiben expresszálódnak. Különbséggént említhető meg, hogy a "kis" replikációs promóter sokkal gyengébb volt, mint a "nagy" replikációs promóter. Meglepő módon a prREPK konstrukciót tartalmazó gyökerek festődése nem volt egyöntetű. A transzformálás folyamán kanamycint tartalmazó tápoldaton 50 kalluszt szelektáltunk ki, ezeknek

24%-a mutatott GUS aktivitást. Amikor a kallusok GUS aktivitás mérése alapján pozitívnak ítélt klonokból növényeket regeneráltattunk és ezen növények gyökereit hisztokémiai festéssel analizáltuk, számunkra ismeretlen okokból csak a gyökerek 45%-a festődött csak. Hasonló jelenséget tapasztaltak Terada és munkatársai (1995), amikor transzgenikus búza növényeket analizáltak, amely tartalmazták a búza csonka hiszton H3 promóterét. Azt tapasztalták, hogy bizonyos promóter szakaszok aktivitásának kimutatása komoly nehézségekbe ütközik. A



5. ábra. A különböző transzgenikus kukorica növények gyökereinek hisztokémiai festődése. A gyökereket X-Gluc tartalmú oldattal kezeltük az Anyagok és Módszerek fejezetben említett módon. Az A és a B ábrán látható növények prREPK konstrukcióval, a C és a D ábrán a prREPN expressziós plazmiddal transzformáltuk. Az A, C ábrán a gyökércsúcs (cs), az A, B, D ábrán az oldalgyökérkezdemények (ok) GUS festődés mintázata látható. A referenciavonal 100 μ m.

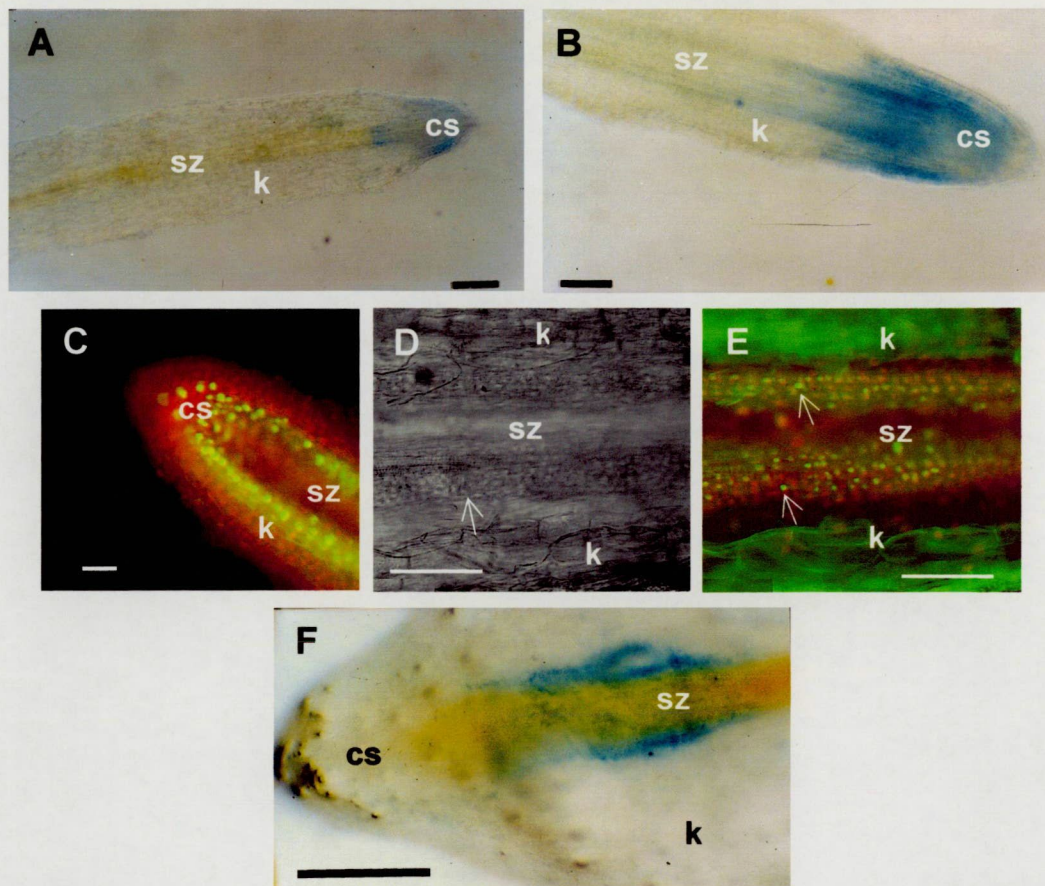
kalluszok szintjén kimutatható volt a promóterek működése, ugyanakkor az ezekből származó gyökereknek csak egyharmada mutatott GUS festődést. A prREPN konstrukciót tartalmazó növények gyökereiben erőteljesebb és egyöntetűbb GUS festődést tapasztaltunk. Itt GUS pozitív kalluszból származó gyökerek 75%-a festődött.

V.3. A sejtosztódás hormonális indukálása elősegíti a virális promóterek működését

Sokoldalúan tanulmányozott kérdés, hogy a növényi hormonok közül az auxin miként szabályozza a növények sejtosztódását (lásd összefoglaló Dudits és mts., 1993). A gyökerek morfológiai egyszerűségük miatt jó modellrendszernek bizonyulnak az auxin hatásának vizsgálatára. Különböző metodikai megközelítéssel nagyszámú növényi promóterről igazoták, hogy azok működése közvetlen auxin szabályozás alatt van.

A nagy replikációs promótert tartalmazó konstrukcióval transzformált növények gyökereit 2,4-D-vel (két különböző koncentrációban (0.2mg/l és 1mg/l)) kezeltük és BrdU beépüléssel, valamint hisztokémiai festéssel analizáltuk. A hormon hatását a gyökércsúcs esetében elég nehézkes vizsgálni, mivel hormon nélkül is nagyon változó az osztódás mértéke, a BrdU beépülése és a hisztokémiai festődés attól függően, hogy a gyökércsúcs a növekedés mely fázisában van. A kezeletlen és a kezelt gyökerek között annyi különbséget tapasztaltunk, hogy a 2,4-D kezelés hatására a gyökércsúcsához közeli (1 cm) periciklussejtek erőteljesebb GUS festődést és osztódást mutattak. Ez mind a BrdU beépüléssel, mind a hisztokémiai festődéssel jól kimutatható volt (6/B,C). Egyes gyökércsúcsok esetében annak ellenére, hogy magában a csúcsban nem lehetett hisztokémiai festődést tapasztalni, 2,4-D hatására a központi hengert határoló sejtek erőteljes GUS festődése volt tapasztalható (6/F). A fénymikroszkópos képeken jól látható, hogy a szállítószövet körül kicsi, sűrű izodiametrikus sejtek formálódtak és ebben a rétegben (6/D,E) erőteljes BrdU beépülés volt tapasztalható, míg más szövetek osztódása nem volt jelentős. Az aktiváció mértéke nem egyöntetű és nem egyforma mértékű. A már differenciálódott

oldalgyökereken három nap elteltével nem tapasztaltunk morfológiai és osztódási különbséget a hormonnal kezelt és a kezeletlen gyökerek között.

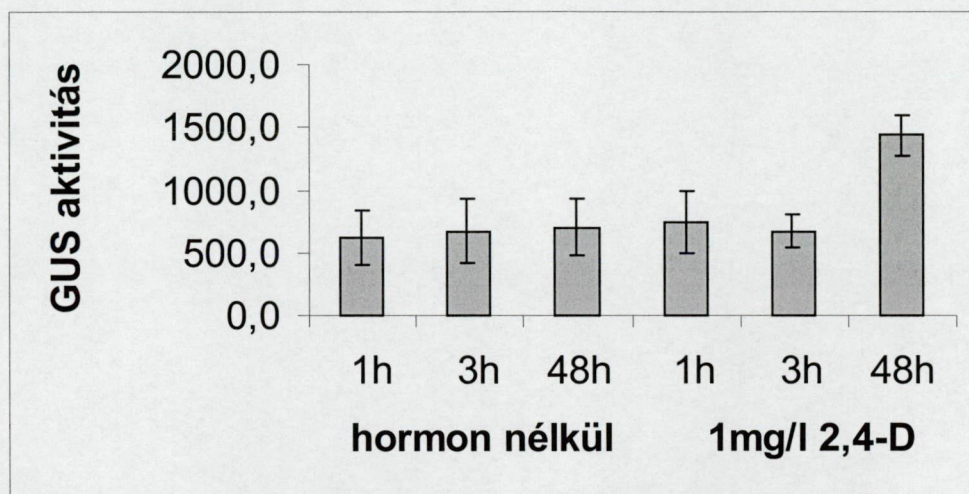


6. ábra. A GUS aktivitás és a BrdU beépülés a prREPN növények gyökerein 2,4-D kezelés hatására. GUS aktivitás 2,4-D kezelés nélkül (A). GUS aktivitás (B) és a BrdU beépülés 2,4-D kezelés után (1mg/l) (C) 2 hetes gyökér esetében. GUS aktivitás 2 hónapos gyökér (F) esetében 2,4-D kezelés után (1mg/l). A C ábrán látható gyökér nagyobb nagyításban a D és az E ábrán látható. A D ábrán a gyökér fénymikroszkópos, az E ábrán a fluoreszcens mikroszkópos képe látható. A D ábrán kivehető a szállítószövet (sz) körül kialakuló izodiametrikus sejtek formálódása (nyíl jelzi). A GUS festést X-gluc tartalmú festékkel készítettük. A BrdU beépülést BrdU elleni FITC konjugált ellenanyag segítségével, fluoreszcens mikroszkóppal mutattuk ki. Zöld fluoreszcencia azokat a sejtmagokat jelzi, amelyekbe a BrdU be tudott épülni (nyíl jelzi), vagyis DNS megkettőződés ment végbe a kezelés folyamán. A piros fluoreszcencia a DAPI festett sejtmagokat tesz láthatóvá, ezekben a sejtmagokban nem történt DNS megkettőződés a kezelés során. A referenciavonal 100 μ m. gyökércsúcs (cs), kéregszövet (k)

Mivel erőteljes egybeesést tapasztaltunk a gyökerek BrdU beépülése és a gyökerek hisztokémiai festődése között, ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a vírus "nagy" replikációs promótere az osztódó sejtekben működik. A "kis" replikációs promótert tartalmazó transzgenikus növények festődése 2,4-D hatására ugyanezeket az eredményeket mutatta, ezért részletes

ismertetésüktől eltekintünk.

Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a 2,4-D-nek van-e közvetlen hatása a virális promóterekre, vagy közvetve, a sejtciklus beindítása révén befolyásolja-e a virális promóterek működését, a transzgenikus kukorica szuszpenziókat 2,4-D-vel kezeltük. A három különböző konstrukciót tartalmazó szuszpenziót, melyek hormonnélküli tápoldatban fejlődtek, 1mg/l 2,4-D-vel kezeltük. A prBF a szuszpenzió hormonkezelésének eredményei láthatók a 7.ábrán. Az eredmény három független kísérlet összegzését mutatja. Látható, hogy a hormon hozzáadása után egy és három óra elteltével a kontroll sejtekhez viszonyítva jelentős



7.ábra. A GUS aktivitás emelkedése transzgenikus kukorica sejtekben (prBF) 2,4-D kezelés hatására. A sejtuszuszpenziót hormon nélkül vagy 2,4-D jelenlétében (1mg/l) különböző ideig kezeltük, majd a különböző mintákból GUS aktivitást mértünk. Az ábrán három független mérés adata látható.

különbséget nem tapasztaltunk, viszont két nappal a hormon hozzáadása után a GUS aktivitás közel a duplájára nőtt. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a 2,4-D közvetlenül nem hat a burokfehérje promóterére, hanem közvetve, a sejtciklus aktiválása révén növeli meg a promóter aktivitását. A prREPK és a prREPN konstrukciókat tartalmazó szuszpenziók is nagyon hasonló módon viselkedtek. Kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy a 2,4-D egyik promóter aktivitását sem befolyásolja közvetlenül, de közvetve a sejtciklus aktiválása

révén mindhárom promóter működését jelentős mértékben képes stimulálni.

4. A burokfehérje gén transzkriptuma a sejtciklus G2-fázisában, a replikációs fehérje gén transzkriptuma a sejtciklus S és G2 fázisában mutatott felhalmozódást

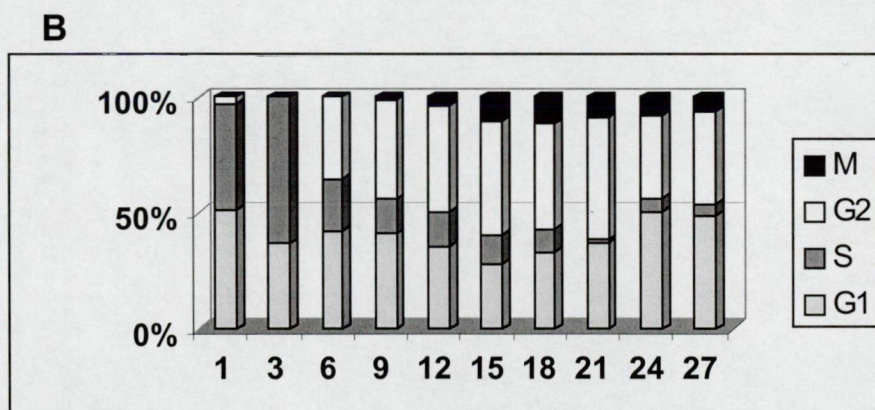
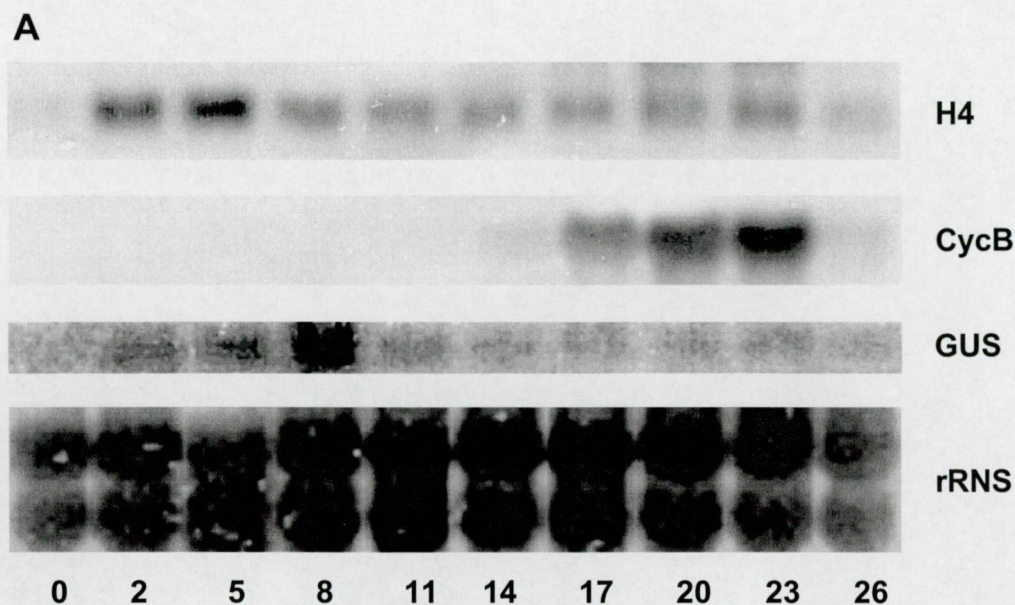
Figyelembe véve a korábban bemutatott eredményeket, amelyek a vizsgált promóterek merisztématikus aktivitását jelezték, joggal merül fel a kérdés, hogy a promóterek mutatnak-e sejtciklus fázistól függő kifejeződést. A feltételezhetően sejtciklus specifikus gének molekuláris jellemzéséhez szükség van jól szinkronizálható sejtszuszpenzióra. Az egyszikű növényekből származó szuszpenziók szinkronizálása még napjainkban sem jól kidolgozott. Sauter és munkatársainak (1997) sikerült rizs szuszpenziót kis hatékonysággal (5 %-os mitotikus index maximum) szinkronizálni hidroxipireával. Laborunkban kifejlesztettünk egy módszert, ami kukorica sejtkultúra szinkronizálására alkalmasnak bizonyult. Az elért eredmények elmaradnak a kétszikű növényekből származó szuszpenziók szinkronizálhatóságától, de a sejtciklus markergének analízise egyértelműen azt mutatja, hogy ez az eljárás alkalmas a sejtciklus reprodukálható szinkronizálására (Peres és mts., 1999).

A sejtciklus alapmechanizmusai az eukarióta rendszerekben magas mértékű konzerváltságot mutatnak (Doonan és mts., 1997; Dudits és mts., 1998). Az eukarióta sejtciklus során két fontos ellenőrzőpont létezik: a késő G1 fázisban, a DNS replikációja előtt, a G2/M fázis határán, a mitózis előtt. A sejtciklusban történő előrehaladásért különböző fehérje kinázok (ciklin-függő kinázok (CDK)) felelősek, amelyek különböző ciklinekkel képeznek komplexeket. A sejtciklus egyes lépéseinek finom szabályozása ezeken a CDK komplexeken keresztül történik. Ez a szabályozás meglehetősen bonyolult és különböző szinteken megy végbe, magába foglalja a transzkripciós folyamatokat, fehérje-fehérje kölcsönhatásokat és foszforilációt/defoszforilációt (Nigg, 1995). Annak ellenére, hogy a kontroll mechanizmusok minden eukarióta élőlényben jelen vannak, az egyes lépések között különbség tapasztalható. A növényekben például, eltérően az élesztőtől és az állati sejtektől, nem csak a ciklinek, hanem a CDK variánsok génjei is sejtciklus fázis függő kifejeződést

mutatnak (Dudits és mts., 1998; Magyar és mts., 1997). A sejtciklus gének expressziós mintázata ugyanakkor erős konzerváltságot mutat az élőszervezetek széles spektrumában, az élesztőktől kezdve a növényeken keresztül az állatokig. Azok a gének, amelyek a DNS replikációval kapcsolatos fehérjéket kódolnak, mint például a replikáció-függő hiszton gének (Chaubet és mts., 1998) főleg a sejtciklus S-fázisában expresszálódnak. Kukoricamagok csírázása során a hiszton H3 és H4 mRNS-ek felhalmozódása jó egyezést mutat a DNS szintézis kezdetével. Hasonlóképpen a sejtciklus S-fázisban megy végbe a hiszton gének expressziója lucerna, rizs és dohány növények esetében is (Chaubet és mts., 1998).

A *prBF* konstrukciót tartalmazó szuszpenziót 5mM hidroxürea segítségével blokkoltuk a sejtciklus S-fázisában. A hidroxürea inhibitora a deoxiribonukleotid reduktáznak és gátolja a dNTP-k szintézisét. A blokkoló anyag eltávolítása után a sejtek felszabadulnak a gátlás alól. Folytatják a sejtosztódást, amit áramlásos citológiai mérésekkel (ÁCM) követtük. Körülbelül a sejtek 47%-át sikerült S-fázisban blokkolni, azaz részleges szinkronizáció tapasztalható a vizsgálat során. A 8.ábrán látható, hogy a hiszton H4 gén mRNS szintje a blokkoló anyag eltávolítása után két órai mintában növekedett és maximumot ért el a következő, azaz az 5 órás mintában. Ez az a periódus, amikor az ÁCM-ben az S-fázisos sejtek száma viszonylag magas. A sejtciklusban történő előrehaladáskor végig jelentős mennyiségű H4 transzkriptum mutatható ki, ami adódhat a szinkron nem tökéletes voltából, vagy pedig más konstitutívan expresszáló hiszton formák kereszt hibridizációjából.

A növényi mitotikus ciklinek szekvencia analízise azt mutatja, hogy növényi ciklinek két fő osztályba sorolhatóak, a CycA és a Cyc B-be (Renaudin és mts., 1996). A két fő csoportba tartozó ciklinek, valószínűleg különböző szerepet játszanak



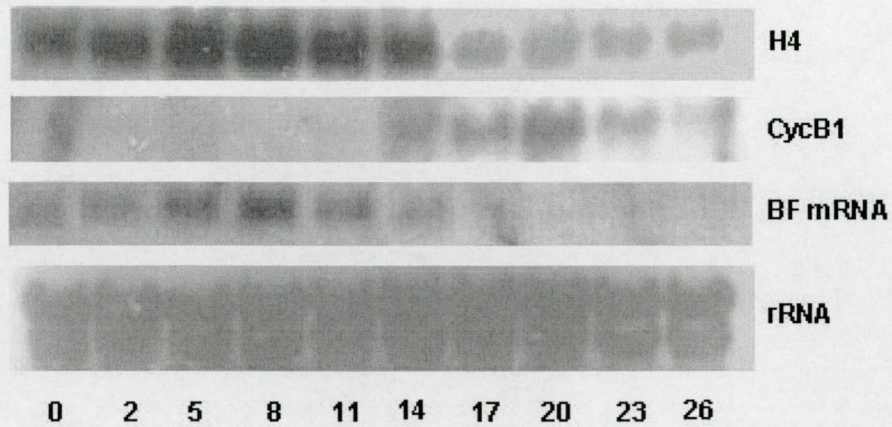
8.ábra. A burokfehérje promóter-GUS riportergén expressziója részlegesen szinkronizált kukorica sejtuszpenzióban. Az A ábra részletesen a különböző gének *Northern* hibridizációs képe látható. A hibridizációhoz próbaként a gének teljes hosszúságú cDNS-ét használtuk. A riboszómális RNS-t etidium-bromid segítségével tettük láthatóvá és ezt használtuk kontrollként. A *Northern* hibridizációval párhuzamosan meghatároztuk 10 000 sejtmag DNS tartalmát áramlásos citológiai méréssel (ÁCM) és mitotikus index analízissel (B ábra). A hisztogrammon látható a különböző sejtmagok relatív frekvenciája (G1 (2C), G2 (4C), S (2C<S>4C) és M). A mitotikus index meghatározásához megközelítőleg 1000 sejtmagot festettünk meg DAPI-val, fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk.

és különböző expressziós mintázatot mutatnak a sejtciklus során. A B típusú ciklinek G2/M fázisos, az A típusú ciklinek korábbi expressziót mutatnak. Munkánk során a

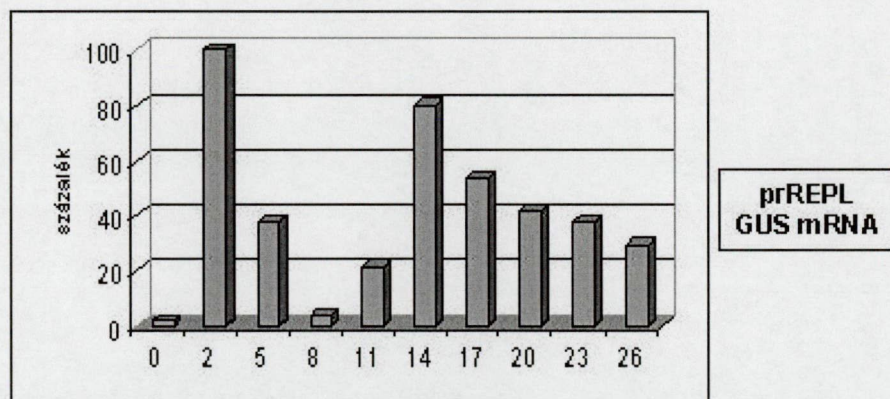
CycB1 gén transzkriptumát követtük nyomon. A blokkoló anyag eltávolítása után 14 órával jelent meg és a maximumát 23 órával a blokkoló anyag eltávolítása után érte el. A sejtciklus markergének mRNS szintjével párhuzamosan vizsgáltuk a burokfehérje promóterrel kifejeztetett GUS mRNS szintjének a változását (7. ábra). A blokkoló anyag eltávolítása előtt a transzkriptum nem detektálható, majd a blokkoló anyag kimosása alatt a szint emelkedett, és 8 órával a blokkoló anyag eltávolítása után érte el a maximumát, majd mennyisége a következő mintákban jelentős csökkent. A GUS transzkriptum szint változása a sejtciklus során az endogén sejtciklus gének transzkriptumával összehasonlítva azt mutatja, hogy a burokfehérje ezen promóter szakasza a sejtciklus korai G2 szakaszában működik a legaktívabban, de már az S-fázisban is mutat aktivitást.

A prREPN 7-es klon szinkronizálása a 9. ábrán látható. Az eredményekből kitűnik, hogy az S-fázisos hiszton H4 gén mRNS szintje ennél a szinkronnál is a blokkoló anyag eltávolítása után 5 órával, az M-fázisos CycB1 gén mRNS szintje pedig 20 órával a blokkoló anyag eltávolítása után éri el a maximumát. Ebben a klonban megtalálható a GUS riportergén előtt a prBF d klonból már jól ismert burokfehérje promóter szakasz, utána a burokfehérje és a burokfehérje saját terminátora. Tehát ebben a klonban egyszerre tudjuk vizsgálni a burokfehérje promóterének működését az egyik irányban és a replikációs fehérje promóterének működését a másik irányban. Az első esetben a burokfehérje transzkriptumát, a második esetben pedig a GUS riportergén transzkriptumát követjük nyomon. A burokfehérje transzkriptumának a változása nagyon hasonló eredményeket mutatott a prBF klonnal kapott szinkronizálási eredményekhez. Vagyis a transzkriptum szintje a blokkoló anyag eltávolítása után 8 órával a legmagasabb, ami a G2 fázisnak felel meg. Ezekből az eredményekből arra is következtethetünk, hogy a burokfehérje génjében nem találhatóak olyan szekvencia elemek, amelyek a saját gén expresszióját befolyásolnák és a burokfehérje saját terminátorának a jelenléte sem

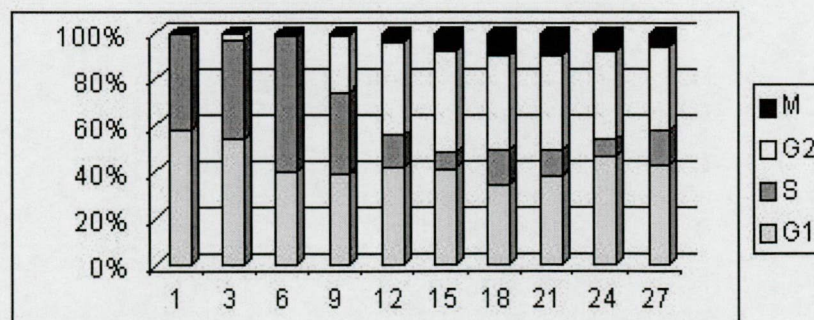
A



B



C

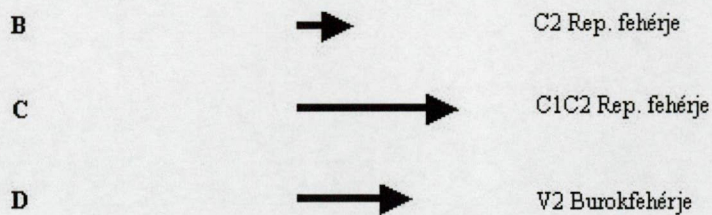
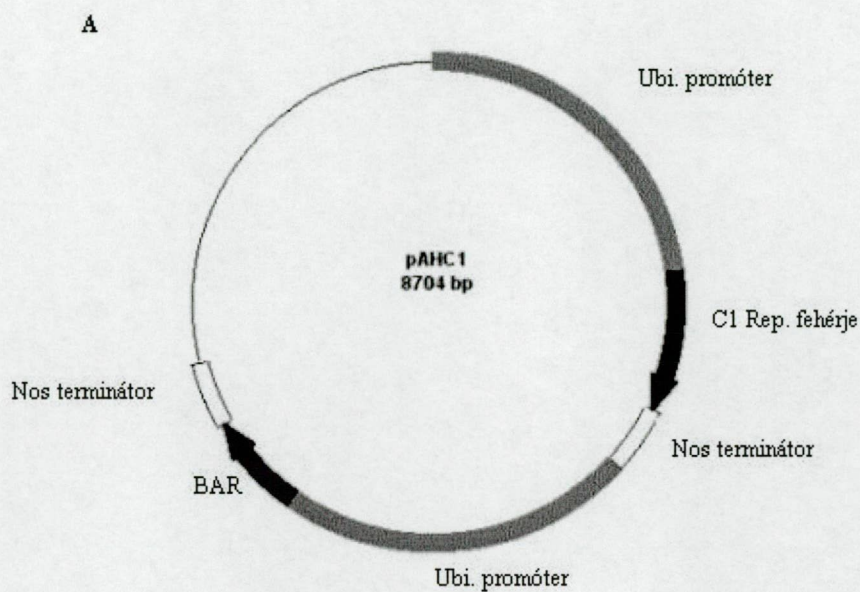


9.ábra. A prREPN konstrukciót tartalmazó transzgenikus kukorica sejtszuspenzió részleges szinkronizálása. Az A ábra részletesen a különböző gének *Northern* hibridizációs képe látható. A hibridizációhoz próbaként a gének teljes hosszúságú cDNS-ét használtuk. A riboszómális RNS-t etidium-bromid segítségével tettük láthatóvá és ezt használtuk kontrollként. A B ábra részletesen a replikációs fehérje promóter expresszió változása látható a kezelés folyamán. A *Northern* hibridizációval párhuzamosan meghatároztuk 10 000 sejtmag DNS tartalmát áramlásos citológiai mérés (ACM) és mitotikus index analízissel (C ábra). A hisztogrammon látható a különböző sejtmagok relatív frekvenciája (G1 (2C), G2 (4C), S (2C<S>4C) és M). A mitotikus index meghatározásához megközelítőleg 1000 sejtmagot festettünk meg DAPI-val, fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk.

befolyásolja ezen gén működését. Tehát ebben a promóter szakaszban megtalálható minden információ, ami a promóter sejtciklus specifikus működéséért felelős. A replikációs fehérje promóterének vizsgálata a nagyon alacsony GUS mRNS miatt elég nehézkesnek bizonyult, ezért a GUS mRNS denzitometriás értékeit mértük és ábrázoltuk (9/C ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a GUS mRNS szintje a blokkoló anyag eltávolítása előtt a kimutathatóság határán volt, a blokkoló anyag kimosása után után jelentősen megemelkedett, és már ebben a mintában elérte a maximumát. Ezután a szint lecsökkent és még egy csúcsot ért el a blokkoló anyag eltávolítása után 14 órával, majd újra lecsökkent. Tehát ennek az RNS-nek a csúcsa a korai S-fázisban a hiszton H4 transzkripció maximuma előtt, majd a G2 fázisban figyelhető meg. Ezek az eredmények azt is jól mutatják, hogy a sejtciklus során a blokkoló anyag eltávolítása után először a replikációs fehérje promótere aktív, utána felváltja a burokfehérje promótere, majd újra a replikációs fehérje promótere lép működésbe. Keveset tudunk a vírusfehérjék poszttranszkripciós módosításáról, bár ezekre az ismeretekre nagy szükségünk lenne ahhoz, hogy a virális gének expressziójának a szabályozását megérthessük.

V. 5. A C2-es replikációs fehérje aktiválja, a burokfehérje pedig represszálja a virion-szensz gének működését.

Eddigi eredményeink és az irodalmi adatok is azt mutatják, hogy a virális promóterek a vírusfehérjék jelenléte nélkül is működőképesek. Az irodalmi adatok azonban azt is alátámasztják, hogy a virális fehérjék jelenléte befolyásolja a virális



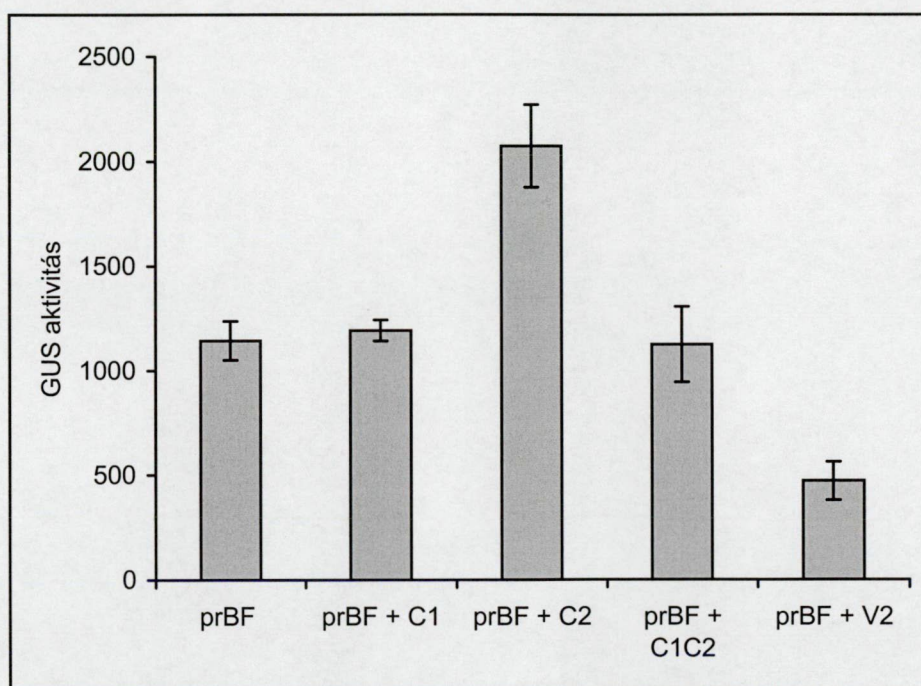
10. ábra. A kukorica transzformálásra felhasznált kiméra konstrukció felépítése. Az összes konstrukció esetében a kukorica ubiquitin promótere mögé építettük be a vírus különböző ő génjeit, azaz a C1 (A), C2 (B), C1C2 (C) és a vírus burokfehérjét (D). A transzkripció terminálására az Agrobaktérium nopalín szintáz gén terminátorát használtuk. Növényi rezisztencia markergénként a foszfinotricin-acetiltransferázt (BAR) használtuk.

promóterek működését. A kettős típusú TGMV vírus esetében tudjuk azt, hogy a vírus replikációs fehérjéje (AL1) és az AL4-es fehérje gátolja a AL61-es promóter működését. A két különböző fehérje gátló helye a promóteren belül máshol van (Eagle és Hanley-Bowdoin, 1997). Erről a víusról szintén ismert az a tény, hogy a virion-szensz géneket a vírus AL2 fehérjéje aktiválja. Az egyes típusú geminivírusok promótereinek transzaktiválásáról még kevesebb információ áll rendelkezésünkre és az irodalmi adatok is ellentmondóak. A WDV esetében a vírus C2-es fehérjéje (Hofer és mts., 1992), a CSMV esetében a C1C2-es fúziós fehérje aktiválta a virion-szensz gének expresszióját (Zhan és mts., 1993).

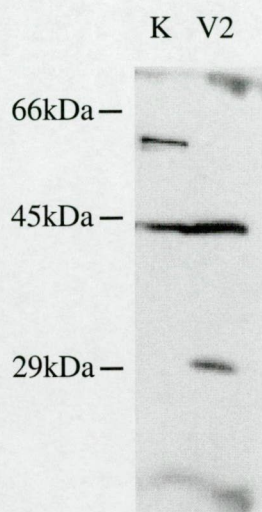
Növényi expressziós konstrukciókat hoztunk létre, amelyek vázlatos képe a 10.ábrán látható. Mindhárom konstrukció a pAHC25-ös vektoron alapul (Christensen AH és mts., 1966). Az Anyagok és Módszerekben ismertetett módon a GUS gén helyére a különböző konstrukciókban a vírus C1, a C2, a C1C2-es és burokfehérje (V2) génjeit helyeztük el.

Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy az MSV esetében melyek azok a vírus fehérjék, amelyek a virion-szensz gének expresszióját befolyásolni képesek, azokat a transzgenikus független kukorica vonalakat transzformáltuk egyenként a négy különböző konstrukcióval, amelyek tartalmazták a vírus burokfehérje promóterét fuzionáltatva a GUS riportergénnel. A transzformálás után három nappal mintát vettünk és a különböző minták totál fehérje extraktumából GUS aktivitást mértünk. A GUS aktivitás értékek a 11.ábrán láthatók (három független klonon mért eredmények átlagát mutatjuk). Az eredmények azt mutatják, hogy a virion-szensz gének expresszióját három nappal a transzformálás után a C1, illetve a fúziós C1C2-es fehérje nem befolyásolta. Ugyanakkor a C2-es fehérje a GUS aktivitást a transzgenikus klonokban közel a duplájára emelte meg. Ezekből a tranziens kísérletekből, nagyon nehéz egyértelműen megállapítani, hogy valójában milyen mértékű a C2-es fehérje transzaktivációja egy bizonyos sejtben, mert ennek a kukorica vonalnak a transzformálási hatékonysága nagyon alacsony. Jelenlegi ismereteink birtokában azt a kérdést is nehéz megválaszolni, hogy miért éppen a C2-es fehérje az, ami képes transzaktiválni a burokfehérje promóterét, mivel ezt a fehérjét eddig még nem sikerült még kimutatni vírussal fertőzött növényekben.

A burokfehérje jelenléte azonban közel a felére csökkentette a virion-szensz gének aktivitását. A burokfehérje szerepe a vírus életciklusában nagy valószínűséggel nem csak a szerkezeti feladatokra korlátozódik, hanem feltételezhetően fontos transzkripció szabályozási folyamatokban is résztvesz. Dupla transzgenikus növényeket hoztunk létre, amelyek tartalmazták a GUS riportergént a három tesztelt promóter szabályozása alatt és kifejezték az MSV burokfehérjét is. A burokfehérjét a burokfehérje elleni poliklonális ellenanyaggal (29 kDa) mutattuk ki (12.ábra). A dupla transzgenikus növények hisztokémiai analízisével

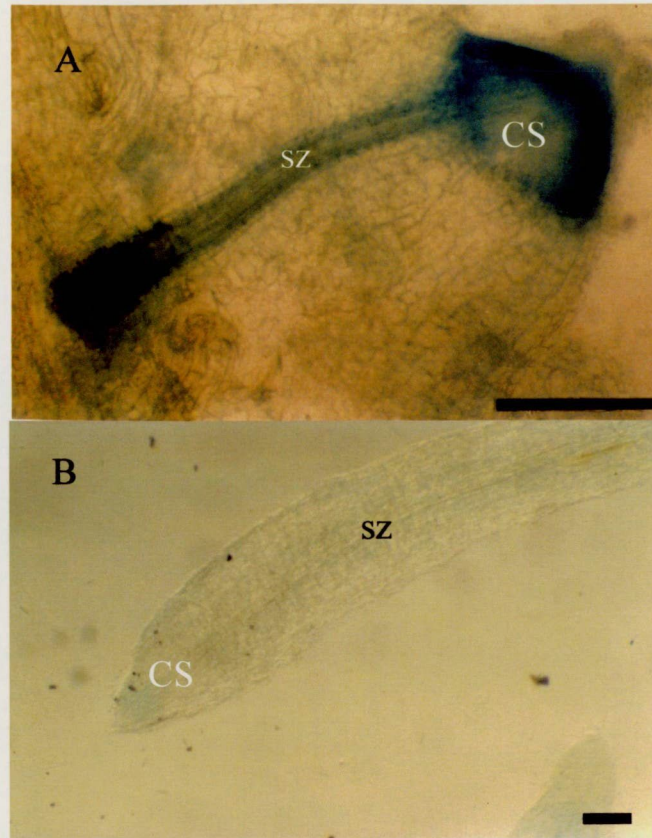


11.ábra. A virális fehérjék hatása a burokfehérje promóter működésére. A tranziens kísérletek GUS aktivitás értékei láthatóak az ábrán. A kukorica vonalat, amely tartalmazta az MSV burokfehérje promóterét, felültranszformáltuk a különböző vírusfehérjékkel.



12. ábra. Az MSV burokfehérje felhalmozódás a transzgenikus kukorica növényben. A transzgenikus növény gyökeréből teljes fehérje extraktum készült, amit Western hibridizációval analizáltunk. He/89: negatív kontroll, V2: transzgenikus növény, ami a burokfehérjét folyamatosan termeli. A fehérje markerek az ábra baloldalán láthatók.

arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a burokfehérje jelenléte befolyásolja-e a virális promóterek expressziójának a mértékét és a szövetspecifitást. Eredményeink azt mutatják, hogy a burokfehérje túlermelletése nem befolyásolta a replikációs promóterek aktivitását. Az egyszeres transzformánsokkal összehasonlítva mind a promóter működés mértékében, mind a szövetspecifitásban teljes azonosságot tapasztaltunk. Azokban az egyszeresen transzgenikus növényekben, ahol csak a burokfehérje promóter-GUS konstrukció volt jelen, erőteljes festődés tapasztalható a gyökerek csúcsában és a szállítószövet környékén. A dupla transzgenikus növények gyökerében azonban, ahol a burokfehérje promóter-GUS és a burokfehérje is jelen van, a festődés mértéke jelentősen, közel a kimutathatósági határig lecsökken (13.ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a burokfehérje gátolja saját génjének az expresszióját, de a replikációs fehérje promóterek működését nem befolyásolja.

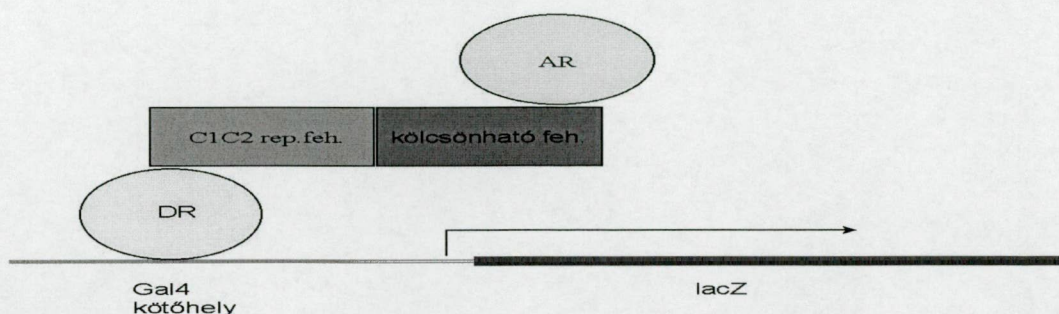


13. ábra. A transzformáns növények gyökerének hisztokémiai festődése. A. Burokfehérje promóter-GUS konstrukciót tartalmazó növény. B. Burokfehérje promóter-GUS és az MSV burokfehérje konstrukciót is tartalmazó növény. A gyökereket X-Gluc tartalmú oldattal kezeltük az Anyagok és Módszerek fejezetben említett módon. A referenciavonal 100 μ m. CS-gyökércsúcs, SZ-szállítószövet

V. 6. A geminivírus fehérje és a gazdasejt fehérjék közötti kapcsolat vizsgálata élesztő két-hibrid rendszer segítségével

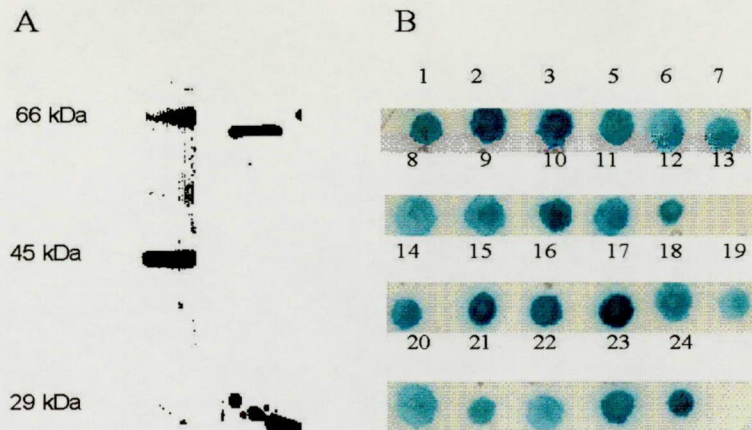
Az emlős onkovírusokhoz hasonlóan a geminivírusok is képesek befolyásolni a gazdasejt sejtciklus szabályozó mechanizmusait. Csoportunkban kimutattuk, hogy fehérje-fehérje kölcsönhatás létezik az MSV C1 fehérje és a kukorica retinoblasztóma fehérje között (Horváth GV és mts., 1998). A fehérje-fehérje kölcsönhatások majdnem mindegyik biológiai folyamatban alapvető jelentőségűek. Munkánk során arra a kérdésre kerestünk választ, hogy van-e kölcsönhatás a vírus C1C2 replikációs fehérje és a gazdasejt fontos sejtciklus szabályozó fehérjei között. Ennek a kérdésnek a megválaszolását az élesztő két-hibrid rendszer segítségével szerettük volna megvalósítani.

A módszer alapja az, hogy számos eukarióta transzkripció aktivátor moduláris szerkezetű: a fehérjében jól elkülöníthető a gének promóter régiójában elhelyezkedő szekvenciaelemeket megkötni képes **DNS-kötő régió (DR)** és a transzkripció komplex fehérjével kölcsönható **aktivátor régió (AR)**. Az élesztő GAL4 transzkripció aktivátor fehérjében is elválasztható egymástól és a fehérje többi részétől az említett két domén. Míg a GAL4 fehérjében a két domén közötti kapcsolatot természetesen a fehérje köztes szakasza biztosítja, kimutatható transzkripció aktivátor hatás akkor is, ha a két domén asszociációját másodlagos kötőerők (fehérje-fehérje kölcsönhatások) biztosítják. Ez az élesztő két-hibrid rendszer működésének alapjaként (14. ábra) olyan plazmid konstrukciókat készítettünk, amelyek két-hibrid fehérjét kódolnak. Az egyik fúziós hibrid fehérjében a GAL4 transzaktivátor DNS-kötő doménjét a C1C2 fehérjével, a GAL4 aktivátor doménjét pedig a kukorica embriógén kalluszból származó cDNS génkönyvtár szekvenciáival építettük össze.



14. ábra. Az élesztő két-hibrid vázlatos felépítése. Abban az esetben, ha fehérje-fehérje kölcsönhatás lép fel a C1C2 replikációs fehérje és a kukorica cDNS gén könyvtár valamely fehérjeje között, a GAL4 transzaktivátor felépül, és beindítja a riportergén működését.

Ezekkel a plazmid konstrukciókkal olyan *Saccharomyces cerevisiae* törzset transzformáltunk, amelynek genomjában a *lacZ* gén található, a regulátor régiója pedig GAL4 kötőhelyet tartalmazta. A transzformációt követően az élesztő sejtekben megkezdődik a két fúziós fehérje termelődése, önmagában azonban egyikük sem képes a riportergén expressziójának aktiválására, mert a DNS-kötő motívumot tartalmazó fehérjének nincs aktivátor régiója, az aktivátor régiót tartalmazó hibrid fehérje pedig nem képes specifikus DNS kötésre. Abban az esetben, ha a vírus replikációs fehérje és a kukorica gén könyvtár valamelyik fehérjeje között fehérje-fehérje kölcsönhatás alakul ki, a GAL4 transzaktivátor képes felépülni és beindítani a riportergén működését. Azokból az élesztőkolóniákból, ahol a riportergén kifejeződhetett (kék színű), a kukorica embriógén kalluszból származó cDNS génkönyvtár plazmidját kinyerhetjük és újra *E coli*-ba transzformálva elegendő DNS-t tisztíthatunk a kölcsönható fehérjét kódoló gén nukleotid sorrendjének meghatározásához. 24 független kék élesztő kolóniát kaptunk (15.ábra). A belőlük származó DNS-t megszekvenáltattuk. A szekvencia analízisek során sok olyan fehérjét találtunk, amelynek nincs ismert homológja az adatbázisban. Két olyan



15. ábra. Az A ábra részleten élesztő sejtekben a C1C2 replikációs fehérje kimutatása látható Western hibridizáció segítségével. A GAL 4 aktivátor doménje elleni monoklonális (egér) antitestet használtunk. A B ábra részleten a pozitív élesztő kolóniák kékülésének a mértéke látható. A kékítést az Anyagok és Módszerekben ismertetett módon végeztük el.

fehérjét kaptunk, amely számunkra érdekesnek bizonyult. Az egyik nagy fokú homológiát mutat egy ubiquitin-konjugáló enzimhez (UBC), amelynek szekvencia részlete a 16. ábrán látható.

Az UBC fehérje aminosavsorrendjének összehasonlítása különböző fajokba tartozó fehérjékkel azt mutatja, hogy ez a fehérje nagyfokú konzerváltságot mutat az élővilágban. A fehérje szerepéről az irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy *humán* sejtekben a rövid életidejű szabályozó fehérjék degradációjáért felelős (Beer-Romero és mts., 1997).

| | | | |
|------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | 1 | | 50 |
| { kukorica 20 } | | | |
| { kukorica uce } | . MASKRI l KE LkDLqkDPpT | SCSAGPaGED | MFHWQATI MG PpDSPYaGGV |
| { arabi. uce } | . MASKRI l KE LkDLqkDPpT | SCSAGPVaED | MFHWQATI MG PaESPYsGGV |
| { hum uce5b } | . MA l KRI h KE L nDLar DPPA | qCSAGPVGDD | MFHWQATI MG PNDSPYqGGV |
| { élesz. uce5 } | ms s SKRI a KE LsDLgr DPPA | SCSAGPVGDD | LYHWQAs I MG PsDSPYaGGV |
| Konszenzus | - MASKRI - KE L- DL- - DPPA | SCSAGPVGED | MFHWQATI MG PNDSPY- GGV |
| | 51 | | 100 |
| { kukorica 20 } | | | |
| { kukorica uce } | FLv nI HFpD | YPFKPPKV s F kTKVFHPNI N | SNGSI CLDI L KEQWSPALTI |
| { arabi. uce } | FLv TI HFpD | YPFKPPKVAf r TKVFHPNI N | SNGSI CLDI L KEQWSPALTI |
| { hum uce5b } | FFLTI HFPTD | YPFKPPKVAf TTr I YHPNI N | SNGSI CLDI L r s QWSPALTI |
| { élesz. uce5 } | FFLs I HFPTD | YPFKPPKVnF TTKI YHPNI N | S s G n I CLDI L KDQWSPALTI |
| Konszenzus | FFLTI HFPTD | YPFKPPKVAf TTKI YHPNI N | SNGSI CLDI L KEQWSPALTI |
| | 101 | | 149 |
| { kukorica 20 } | | | DRAKYE s TAR s WTQKYAMG |
| { kukorica uce } | SKVLLSI CSL | LTDPNPDDPL VPEI AhmYKT | DRp KYEs TAR s WTQKYAMG |
| { arabi. uce } | SKVLLSI CSL | LTDPNPDDPL VPEI AhmYKT | DRAKYEa TAR n WTQKYAMG |
| { hum uce5b } | SKVLLSI CSL | LcDPNPDDPL VPEI Ar I YKT | DRe KYnr i AR EWTQKYAM |
| { élesz. uce5 } | SKVLLSI CSL | LTDaNPDDPL VPEI Aq I YKT | Dk AKYEa Tak EWTk KYAv. |
| Konszenzus | SKVLLSI CSL | LTDPNPDDPL VPEI A- I YKT | DRAKYE- TAR EWTQKYAMG |

16. ábra. Az Ubiquitin-konjugáló enzim aminosavszekvenciáinak összehasonlítása különböző fajokban. A legelső szekvencia a kísérleteinkben az élesztő kölcsönhatás eredményeként kapott fehérje szakasz.

A másik fehérje a G10-es transzkripciós faktor. Ennek a fehérjének a funkciójáról szintén kevés információ áll rendelkezésünkre. Suzuki és munkatársai (1995) kimutatták, hogy ez a fehérje egy olyan transzkripciós faktor, ami a GC-boxokhoz kapcsolódik a gének promóterében és a promóter mögötti gén expresszióját negatívan szabályozza (17.ábra).

| | | | | | | |
|----------------|----------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------------------|-------|
| | 1 | | | | | 50 |
| {kukorica G10} | | | | | | |
| {humán G10} | MPKVK ^r SR. K | APqDGWELI E | PTLDqLDQKM | REAETE. . PH | EGKRK ^v ESLW | |
| {arabi. G10} | MPKVKTnR. v | kyPEGWELI E | PTLr ELDaKM | REAETD. . s H | DGKRK ^c Et LW | |
| {éleszt. G10} | MP ^r I KTr Rs K | paPDGFekI k | PTLt DFEi qL | RDAqkDkss k | laaksnEqLW | |
| Konszenzus | MPKVKTSR- K | APPDGWELI E | PTLDELQKM | REAETD- - PH | - GKRK- ESLW | |
| | 51 | | | | | 100 |
| {kukorica G10} | | | | | | |
| {humán G10} | PI Fr I HHQkt | RYI FDLFYKR | KAySr ELI Di | CyKEGl ADk N | LI AKWKKp GY | |
| {arabi. G10} | PI FkVs HQRS | RYVYDLYYr R | eeI SkELYEF | Cl dqGYADr s | LI AKWKKs GY | |
| {éleszt. G10} | eImql HHQRS | RYI Yt LYYKR | KAI SkDLYDW | li KEkYADkl | LI AKW Kt GY | |
| Konszenzus | PI F- I HHQRS | RYI YDLYYKR | KAI S- ELYEF | C- KEGYAD- N | LI AKWKKQGY | |
| | 101 | | | | | 150 |
| {kukorica G10} | ERLCCLRCI Q | TRDhNFaTTC | VCRVPK. HLr | ED. | Rl IECVHCGC | |
| {humán G10} | gnLCCLRCI Q | TRDt NFGTn C | I CRVPKSkLe | vg. | RI IECt HCGC | |
| {arabi. G10} | ERLCCLRCI Q | pRDhNYGTTC | VCRVPK. HLr | EE. | kVVECvHCGC | |
| {éleszt. G10} | EkLCCLRCI Q | knEt NnGs TC | I CRVPra qLe | EEarkkgt qv | sfhqCVHCGC | |
| Konszenzus | ERLCCLRCI Q | TRD- NFGTTC | - CRVPKSHL- | E- - - - - | RI IECVHCGC | |
| | 151 | | | | | |
| {kukorica G10} | RG. | | | | | |
| {humán G10} | RGCs g. . | | | | | |
| {arabi. G10} | qGCASGD | | | | | |
| {éleszt. G10} | RGCASt D | | | | | |
| Konszenzus | RGCASGD | | | | | |

17. ábra. A G10 fehérje aminosavszekvencia összehasonlítása különböző fajokban. A legelső szekvencia a kísérleteinkben az élesztő kölcsönhatás eredményeként kapott fehérje szakasz.

VI. Megvitatás

Napjainkban elég kevés információ áll még rendelkezésünkre a geminivírusok promótereinek működéséről. Az irodalmi adatokra támaszkodva feltételezhetjük, hogy a geminivírusok a gazdasejt transzkripció mechanizmusait használják fel a virális gének expressziójához és a promótereik a megfelelő virális fehérjék jelenléte nélkül is működőképesek. A III típusú geminivírusok közé tartozó bors vírus (Pepper huasteco virus (PHV)) burokfehérje promóterét tartalmazó transzgenikus dohány növények hisztokémiai festődése azt mutatta, hogy festődés az edénnyaláb szövetekben az oldalrügyek környékén és a szár felső részén tapasztalható. Nem tapasztaltak GUS festődést a levélben vagy más szövetekben (Ruiz-Medrano és mts., 1999). Az ugyanebbe a családba tartozó TGMV vírus burokfehérje promóterével (a transzlációs iniciációs kódon előtti 657 bp) létrehozott dohány növények festődése azt mutatja, hogy festődés van floemben, azonban sem a mezofil sem más szövetekben nem tapasztalható (Sunter és Bisaro, 1997). Az általunk vizsgált MSV-vel közelebbi rokonságot mutat a WDV, amelyről Goodin és munkatársai (1999) kimutatták, hogy csak az aktívan osztódó sejtekben (búza embrió csúcsa, de nem a határoló sejtekben) tapasztaltak GUS festődést. A replikációs fehérje promóterét tartalmazó konstrukciók túltermeltetése transzgenikus növényben eddig még nem történt meg.

Csoportunkban létrehoztunk olyan transzgenikus kukorica növényeket, amelyek lehetővé teszik az MSV burokfehérje és a replikációs fehérje promótereinek vizsgálatát. Annak ellenére, hogy a GUS festődés alapján mindkét vizsgált virális promóter szakasz csak az osztódó sejtekben gazdag gyökér merisztémákban és az oldalgyökér kezdeményekben mutat aktivitást, különbséget tapasztaltunk a két promóter működésének erősségében. A merisztéma specifikus aktivitás meglepő az MSV esetében, mivel a vírus részecskék a kukoricalevél különböző típusú sejtjeiben kimutathatóak (Lucy és mts., 1996). A növényi hiszton gének promótereinek analízise azt mutatja, hogy több evolúciósan konzervált motívumot lehet találni bennük. Ilyen például az úgynevezett oktamer motívum (CGCGGATC) és ennek különböző formái (CCGGATC, CGCGGATT és mások, melyek ismertetésétől eltekintünk) (Terada és mts., 1995). Pontos szerepük a mai napig sem tisztázott és csak annyit tudunk róluk,

hogy a hexamer motívummal (ACGTCA) együtt a hiszton gének S-fázis és merisztéma specifikus expresszióját biztosítják. Ezek a cisz elemek a kukorica hiszton H3 gén promóteriben is megtalálhatók (Atanassova és mts., 1998). A hexamer motívum a hiszton gének promóterén kívül a karfiol mozaik vírus (CaMV) 35S promóterében (Benfey és mts., 1990), vagy a bakteriális oktopin szintetáz enhanszerének szekvenciájában is jelen van (Bouchez és mts., 1989). Az oktamer motívum egy változata (GGCGGATT) megtalálható a vírus LIR régiójában, a hexamer motívum pedig a burokfehérje génjében (559 bp-nál). A “nagy” replikációs fehérje promóter feltételezhetően tartalmaz olyan cisz elemeket, amelyek a replikációs fehérje aktivitását pozitívan befolyásolják, ami az erőteljesebb festődésben és a GUS pozitív gyökerek nagyobb frekvenciájában megmutatkozott a kísérleteink során. Terada és munkatársai (1995) kimutatták, hogy a búza hiszton H3 génjének merisztéma specifikus működéséért elsősorban az oktamer motívum felelős, de hatását a hexamer motívum tovább erősíti.

A GUS aktivitás értékek, amelyeket a transzgenikus sejtszuszpenziókon mértünk, azt mutatják, hogy a burokfehérje ezen promóter szakasza a legerősebb a három konstrukció esetében. Ez az eredmény jó egyezést mutat azokkal a kísérletekkel, amelyekben Boulton és munkatársai (1991) kimutatták, hogy MSV-vel fertőzött levelekben a vírus szensz száláról sokkal több RNS termelődik, mint a komplementer szálról. A kalluszokon mért GUS aktivitás értékek is mutatták azt az aktivitásbeli különbséget, amit a két különböző replikációs fehérje promóter esetében a gyökerek hisztokémiai festésénél tapasztaltunk. Ezek az eredmények megerősítik azt a feltevésünket, hogy a virális genomban a LIR-en kívül található olyan szekvencia elem, ami pozitívan befolyásolja a replikációs fehérje génjének a működését.

A három promóter szakasz működését tranziens kísérletben is vizsgáltuk, mivel ezek a kísérletek jelentős mértékben hozzájárulhatnak a promóterek szabályozásának a megismeréséhez. A prBF konstrukcióval végzett kísérletek során jelentős GUS aktivitást tapasztaltunk, ugyanakkor a prREPK és a prREPN konstrukcióval végzett transzformálás során az aktivitás értéke két-három nappal a transzformálás után csak a háttér szintnek felelt meg. Ezeknek az eredményeknek az

lehet a magyarázata, hogy a kukorica protoplasztok csak öt nappal a transzformálás után kezdenek el osztódni. Feltételezhetjük, hogy a prREPK és prREPN-ben található promóter szakaszok csak osztódó sejtekben működnek, és ezért nem tapasztalunk GUS aktivitást két és három nappal a transzformálást követően ezekben a sejtekben. Ugyanakkor feltételezhetjük, hogy a prBF konstrukcióban található promóter szakasz a sejtosztódásra kompetens sejtekben is működőképes, ezért tapasztalhatunk aktivitást a transzformálás után két és három nappal.

Munkánk során bizonyítani szerettük volna, hogy az MSV promóterei valóban az osztódó sejtekben működnek, ezért a transzgenikus gyökereket BrdU-nal kezeltük. A BrdU-beépülés megoszlása a gyökérsejtekben nagymértékű azonosságot mutatott a hisztokémiai festődéssel. BrdU beépülést tapasztaltunk a gyökércsúcsban, az oldalgyökérképződményekben és a szállítószövet egyes sejtjeiben. A hisztokémiai festődéshez hasonlóan az idősebb gyökerekben gyengébb, a fiatalabb gyökerekben erőteljesebb BrdU beépülést, vagyis sejtosztódást tapasztaltunk. Ezek a megfigyelések közvetett módon arra engednek következtetni, hogy az MSV promóterek működése kapcsolatban áll a sejtek osztódásával.

A növények növekedését és fejlődését befolyásoló hormonhatású vegyületek kémiai szerkezetüket tekintve nagyfokú változatosságot mutatnak. Ezek a viszonylag kisméretű molekulák, amelyek egymással is kölcsönhatásban vannak, egyidejűleg a sejtfunkciók széles körét befolyásolhatják a növény legkülönbözőbb szerveiben (Dudits, 1999). Az auxin fontos szerepet játszik a szállítószövetek differenciálódásában (Aloni és mts., 1987), az apikális dominancia szabályozásában (Cline, 1994), a sejtmegnyúlásban (Yang és mts., 1993) és a sejtosztódásban (Boer és Murray, 2000; Pasternak és mts., 2000). Muday és Haworth kimutatták (1994), hogy az auxinnak kulcsszerepe van az oldalgyökerek képződésében is, a hormon pontos feladata azonban nem ismert. Az oldalgyökérképződésnek több fázisa van. Először megtörténik a periciklussejtek reaktivációja, majd az oldalgyökérkezdemény differenciációja, a legvégső fázis pedig a merisztéma kialakulása az új oldalgyökerek csúcsában, miután az oldalgyökér a kéregszövetet és az epidermiszt már átszakította. Jelenleg még kevésbé ismertek azok a korai folyamatok, amelyek 2,4-D kezelés hatására lépnek fel kukorica gyökereken. A mi eredményeink azt mutatják,

hogy a 2,4-D hatása a szállítószövetrendszer körülvevő periciklus sejteken három nappal a kezelés után jelentkezik erőteljesen. A hormonra, a gyökerek különböző részei nem azonos módon reagálnak. A gyökércsúcsához közeli, eleve osztódó vagy a differenciálódás egy alacsonyabb fokán álló periciklus sejtek jelentős aktiválódást mutatnak, ami erőteljes BrdU beépülésben és hisztokémiai festődésben nyilvánul meg. Az osztódás mértéke olyan erőteljes, hogy a fénymikroszkópos képeken jól látható, hogy a szállítószövet körül kis, sűrű izodiametrikus sejtek képződnek. Az aktiválhatóság mértéke a szövet öregedésével jelentősen csökken, valószínűleg ez az oka annak, hogy a gyökér azon részén, ahol az oldalgyökerek képződnek, a kezelés hatására az eredetileg nem osztódó periciklus sejtekben is osztódás tapasztalható, de nem alakul ki a szállítószövet körül morfológiailag is megfigyelhető új réteg. A mi eredményeinkhez hasonlóan tapasztaltak sárgarépa hipokotil esetében is, ahol a 2,4-D kezelés eredmények azt mutatták, hogy a hormon csak a periciklus sejtekre hat, amíg a többi sejtet nem aktiválja, ez abban nyilvánult meg, hogy nagymennyiségű kisméretű osztódó sejt keletkezett három nappal a kezelés után a szállítószövet körül (Guzzo és mts., 1995). Ugyanakkor a szövet öregedésével az aktiválhatóság mértéke nagymértékben lecsökkent (Alizadeh és Mantell, 1991). Munkánk során a már differenciálódott oldalgyökereken a hormonnal kezelt és a kezeletlen gyökerek között három nap elteltével nem tapasztaltunk morfológiai és osztódási különbséget. Kukorica gyökereken végzett kísérleteinkből arra következtethetünk, hogy a három napos 2,4-D kezelés az oldalgyökérképződés legkorábbi fázisára, a periciklus sejtek reaktiválódására hat. A kukorica sejtek eléggé toleránsak 2,4-D-vel szemben. Feltehetőleg ezzel magyarázható, hogy a két különböző 2,4-D koncentráció hatása nagymértékű egyezést mutatott.

A vírusfertőzés helyi, esetleg szisztematikus stresszként hat a növényekre. Erre az egyes növények auxin vagy/és etilén termelésével felelhetnek (Mayda és mts., 2000; Tornero és mts., 1997). A megemelkedett hormonszintnek fontos szerepe lehet a gazdasejt-patogén kölcsönhatás szabályozásában. A növényi vírus promóterek auxin függő stimulálása nem ritka jelenség, és gyakorta a vírus promóterek közvetlen aktiválásában nyilvánul meg (Niggeweg és mts., 2000). Ismertek azok a cisz elemek (ARE), amelyek a promóterek auxin függését okozzák

(Guilfoyle és mts., 1998). Az egyik ilyen motívum (TGTCTC) megtalálható az MSV C1 gén szekvenciájában, de hiányzik az összes konstrukcióból, amelyet munkánk során felhasználtunk. A gyökereken végzett 2,4-D kezelések alapján geminivírusok esetében nekünk sikerült először kimutatnunk, hogy az auxin aktiválja a virális promóterek működését. További kísérleteket igényelt annak a ténynek a megállapítása, hogy az MSV promóterek válasza auxinra közvetlen vagy pedig a sejtosztódás reaktivációja révén közvetett módon jelentkezik-e. Erre a kérdésre sejtuszpenzió végzett hormonkezelések segítségével kerestünk választ. Eredményeink azt mutatják, hogy az MSV promóterek auxin hatására egy aránylag késői válasszal reagálnak, ezért feltételezzük, hogy a 2,4-D aktiváló szerepét nem közvetlenül, hanem közvetve, a sejtciklus reaktiválása révén fejt ki. Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy az MSV promóterek közvetlenül aktiválhatóak-e 2,4-D-vel további kísérletek tervezünk.

A növényi fejlődés és növekedés folyamatos osztódások következménye, ami a növények merisztémáira korlátozódik. Míg egyes geminivírusok teljes mértékben floem specifikusak (Abouzid és mts., 1988; Sanderfoot és Lazarowitz, 1996b), és így ki tudják használni a prekambiális sejtek merisztématikus aktivitását saját életciklusuk véghezviteléhez, addig mások, köztük az általunk vizsgált MSV is, a már differenciálódott sejtekben is kimutathatóak és ott szaporodni is képesek (Rushing és mts., 1987; Nagar és mts., 1995; Lucy és mts., 1996). A geminivírusok replikációs ciklusa a gazdasejt replikációs mechanizmusait használja. Mivel ezek a tényezők csak az osztódó sejtekben vannak jelen, joggal feltételezhetjük, hogy geminivírus fertőzés elősegíti a differenciálódott növényi sejtek visszatérését a növényi sejtosztódási ciklusba (Gutierrez, 2000). Egyelőre még nem tisztázott, hogy a sejtek a vírusfertőzés hatására visszatérnek az S-fázisba vagy csak specifikus S-fázisszerű funkciók reaktiválódnak. A sejtuszpenziók szinkronizálása hasznos információt nyújthat a gének sejtciklus szabályozásáról. A szinkronizálási eredményeink azt mutatják, hogy burokfehérje vizsgált promóter szakasza a sejtciklus korai G2-fázisában, a replikációs fehérje promóterének expressziója pedig a korai S-fázisban a hiszton H4 transzkripciója előtt, majd a G2 fázisban tapasztalható.

Irodalmi adatokból ismert, hogy az emlős tumor vírusok képesek megváltoztatni a gazdasejt sejtciklusát azáltal, hogy a vírus korai fehérjéi hozzákapcsolódnak az Rb fehérjéhez (Vousden és mts., 1993). A konszenzus Rb kötő motívum LXCXE az MSV, a WDV és a DSV replikációs fehérjében egyaránt megtalálható (Gutierrez, 2000). A virális gének mRNS szintjének a különbsége az MSV életciklusának ismeretében részben megmagyarázható. A replikációs promóter magas aktivitása 2 órával a hidroxürea eltávolítása után jelezheti, hogy a C1 és/vagy a C1C2 replikációs fehérjékre a vírusnak még a gazdasejt DNS készletének replikációja előtt szüksége van. A C1 fehérje kapcsolódik a kukorica retinoblasztómaszerű fehérjéhez, és ezáltal feltételezhetően szabályozza a sejtek sejtciklusának G1-S fázisos átmenetét (Horváth és mts., 1998; Gutierrez, 2000). Így tehát a C1 fehérje génjének korai expressziója elősegítheti a gazdasejt sejtciklusának aktiválását. Ennek a génnek a működése a sejtciklus S-fázisában más funkcióval is összefüggésben állhat: a C1C2 replikációs fehérje jelenléte elengedhetetlenül szükséges a virális genom replikációjához. Ez az a fehérje, amely a virális genom DNS szintézise során az iniciációs lépésért felelős, és endonukleáz aktivitása révén a virion-szensz szálát a konzervatív régióban elhasítja (Hanley-Bowdoin és mts., 1999). A konzervatív régió (TAATATTAC) az összes geminivírusban megtalálható.

A replikációs fehérje génjének expresszió növekedése a sejtciklus G2 fázisában sokkal meglepőbb és nehezebben értelmezhető. Feltételezhetően ennek a fehérjének a jelenléte gátolja a sejtek G2 fázisba való belépést és a vírussal fertőzött sejteket becsapdázza a sejtciklus S-fázisába (Nagar és mts., 1995). Erre utalhat, hogy azok a transzgenikus dohány sejtek, amelyek tartalmazzák a TGMV replikációs fehérjét, az osztódás folyamán a megduplázódáshoz szükséges idő jelentősen hosszabb mint a vírus fehérjét nem tartalmazó sejtek esetében tapasztalható. Hasonló gátlást figyeltek meg állati DNS tumorvírusok esetében (SV40), amelyek szintén képesek a gazdasejtet a vírus életciklusának megfelelő állapotba hozni. A G2-ből az M-fázisba történő átlépéshez a sejtciklus függő fehérje kináz (cdc2) aktiválódása szükséges. Scarano és munkatársai (1994) kimutatták, hogy az SV40 nagy T antigénje megakadályozza a ciklin B-cdc2 komplex aktiválódását, így késlelteti sejtciklus G2-fázisában az előre haladást.

A növényi vírusok burokfehérjei különböző funkciókban vállalhatnak szerepet: elősegítik a vírus partikulum felépülésében (Satyanarayana és mts., 2000), magának a víruspartikulumnak szerkezeti egységét képezik (Hanley-Bowdoin és mts., 1999) és közreműködhet a vírus sejtről-sejtre való vándorlásában is (Liu és mts., 2001). Csoportunkban kimutattuk, hogy az MSV burokfehérje génjének sejtciklus függő expressziója van. Ez alapján feltételezzük, hogy ennek a fehérjének a szerepe nem korlátozódik a fent említett funkciókra hanem a vírus életciklusa során más fontos feladatokra is kiterjed. Geminivírus fertőzés során az egyes-szálú DNS bejut a sejtmagba, ahol megtörténik a második szál szintézise. A második szál létrehozása a vírus segítsége nélkül, kizárólag a gazdasejt fehérjével megy végbe, a DNS szintézishez azonban a sejteket vissza kell juttatni a sejtciklusba. Feltételezhetjük, hogy mivel a burokfehérje az egyetlen virionban megtalálható vírus fehérje, ez a fehérje létesít a fertőzés korai fázisában kölcsönhatást a különböző transzkripció faktorokkal és/vagy aktiválja közvetlenül a gazdasejt promótereit. A burokfehérje hatására így egy S-fázis szerű környezetet alakít ki, ahol a szintetikus folyamatok már végbe tudnak menni.

Eddigi eredményeink, és az irodalmi adatok is arra utalnak, hogy a virális promóterek vírusfehérjék jelenléte nélkül is működőképesek. Az irodalmi adatok azonban azt is alátámasztják, hogy a virális fehérjék jelenléte befolyásolja a virális promóterek működését. A III típusú TGMV vírus esetében ismert, hogy a vírus replikációs fehérje (AL1) és az AL4-es fehérje gátolja a AL61-es promóter működését. A két különböző fehérje gátló helye a promóteren belül különböző helyeken található (Eagle és Hanley-Bowdoin, 1997). Erről a vírusról azt is tudjuk, hogy a virion-szensz géneket a vírus AL2 fehérje aktiválja. Az AL2 fehérje kötődése a promóteren belül nem szekvenciaspecifikus, ahogy nem az a TYLCV C2 fehérjéje sem, amelyről szintén bizonyított, hogy a virion-szensz géneket aktiválja (Noris és mts., 1996). A szabályozás szövetspecifikus módon is kifejeződik. Irodalmi adatok utalnak a burokfehérje aktiválása mellett a gátlására is. Miközben a TGMV AL2 fehérje a burokfehérje promóterét a mezofill sejtekben aktiválja, a floem sejtekben gátló hatást fejt ki (Sunter és Bisaro, 1997). Az egyes típusú geminivírusok promótereinek transzaktiválásáról még kevesebb információ áll rendelkezésünkre, és

az irodalmi adatok is ellentmondóak. A WDV vírus esetében a vírus C2-es fehérje (Hofer és mts., 1992), a CSMV vírus esetében a C1C2-es fúziós fehérje aktiválta a virionszensz gének expresszióját (Zhan és mts., 1993). Munkánk során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az MSV esetében melyek azok a vírus fehérjék, amelyek a virion-szensz gének expresszióját befolyásolni képesek. Eredményeink azt mutatták, hogy a C1 és a C1C2-es fehérje nem befolyásolta a virion-szensz gének expresszióját. A C2-es fehérje körülbelül a duplájára növelte, a burokfehérje pedig megközelítőleg a felére csökkentette a virion-szensz gének aktivitását. A geminivírus fertőzés korai szakaszában valószínűleg nincs szükség jelentős mennyiségű burokfehérjére. Ebben az időszakban a gazdasejt átprogramozása és a virális genom replikációja a replikációs fehérjék segítségével megy végbe. Amikor már nagymennyiségű kettős szálú virális DNS termelődött, a C2 fehérje feltételezhetően kapcsolóként működik és előidézi a korai fázisból a késői fázisba való átmenetet azáltal, hogy fokozza a burokfehérje termelődését. A megnövekedett mennyiségű burokfehérje felelős a virális DNS bepakolódásáért és a vírus partikulumok kialakulásáért a fertőzés késői szakaszában (Hanley-Bowdoin és mts., 1999).

A virális gének bonyolult szabályozását jelzi, hogy míg a virion-szensz gének működését a C2 fehérje aktiválja, a csoportunkban először leírt eredmények szerint a burokfehérje képes represszálni saját génjének működését. Feltételezhetően fontos információt nyújtana a vírus életciklusának megértése szempontjából annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a két fehérje térben és időben hogyan hat. Jelenlegi ismereteink birtokában ugyanis nehéz választ adni arra, hogy mi lehet a szerepe a burokfehérje szintézis gátlásának. A burokfehérje szerepe a vírus életciklusában nagy valószínűséggel nem csak szerkezeti feladatokra korlátozódik, hanem feltételezhetően fontos transzkripció szabályozási folyamatokra is kiterjed. Az ACMV burokfehérje 30-40%-al csökkentette a komplementer gének expresszióját (Hong és mts., 1995). Az MSV burokfehérjéről pedig bizonyított, hogy képes a kettős-szálú virális DNS genomhoz kötődni, ami a transzkripciót szabályozó szerepét valószínűsíti (Liu és mts., 1997).

Az állati onkovírusokhoz hasonlóan a geminivírusok is a gazdasejt replikációs mechanizmusait használják fel saját DNS-ük replikációjához és differenciálódott

sejtekben is képesek replikálódni. Az emlős tumor vírusok különböző mechanizmusok kombinációját használják fel arra, hogy a gazdasejt replikációs fehérjéinek termelődését előidézzék. Az adenovírus E1A és az SV40 nagy T antigénje közvetlenül is aktiválni tudja a gazdasejt gének transzkripcióját azáltal, hogy fehérje-fehérje kölcsönhatást létesít a gazdasejt transzkripció faktoraival (Lee és mts., 1991; Gruda és mts., 1993; Labrie és mts., 1995; Damania és mts., 1996; Eckner és mts., 1996). Geminivírusok esetében a TGMV-ről ismert, hogy a fertőzés során megváltoztatja az osztódó sejt nukleáris antigén (PCNA) transzkripció kontrollját dohány levelek sejtjeiben, ami a differenciálódott sejtekben magasszintű mRNS és fehérje termelésben nyilvánul meg (Egelkrout, Robertson és Hanley-Bowdoin készülő publikáció). A TGMV replikációs fehérje az emlős DNS tumorvírusokhoz hasonlóan közvetlenül aktiválhatja a PCNA promóterét. A szekvencia specifikus DNS kötődés (Fontes és mts., 1992) és a transzkripció szabályozó szerepe (Eagle és Hanley-Bowdoin, 1997) alátámasztják ezt a lehetőséget. Élesztő két-hibrid technológia segítségével kerestük azokat a feltételezhetően sejtciklus szabályozó fehérjéket, amelyek az MSV C1C2 replikációs fehérjéhez kapcsolódnak. Az egyik talált fehérje egy transzkripció faktor (G10), amely eddig kukoricából nem volt ismert. A növényi homológok szerepe nem ismert. Az a kevés információ, ami rendelkezésünkre áll, emlős rendszerekből származik. A patkány G10-es transzkripció faktorról Oda és munkatársai (1998) kimutatták, hogy a GC-box motívumot tartalmazó promóterek szabályozásában játszanak szerepet. Olyan transzkripció represszorok, amelyek az Sp1 transzkripció faktor kötőhelyére képesek bekötődni. Expressziójuk a sejtciklus szabályozása alatt áll, és DNS tumorvírus fertőzés nagymértékben megemeli a fehérje termelésének szintjét. A másik fehérje az ubiquitin-konjugáló enzimek (UCE) egyik csoportjába tartozik. Erről a fehérjéről is elmondhatjuk, hogy a növényi homológok szerepéről nagyon keveset tudunk, de a kukorica és az emlős sejtekben található fehérjék között olyan erős a konzerváltság, hogy az állati rendszerekben szerzett információk utalhatnak a kukorica fehérje funkciójára is. Az emberi UCE5b az ubiquitinfüggő fehérje lebontó rendszer része és fontos szerepe van a szabályozó fehérjék degradációjában (Rolfe és mts., 1995). Az egyik ilyen a p53 tumor szupresszor fehérje, amelyik az emlős

sejtciklus egyik legfontosabb szabályozó komponense és tumoros sejtekben gyakran mutációt tartalmazó formában van jelen. A p53 féléletideje emlős sejtekben nagyon rövid, átmeneti felhalmozódás csak a DNS károsodása során tapasztalható. Több emberi tumor vírusról kimutatták, hogy termelnek egy olyan antigént, amely elősegíti a p53 lebomlását (Vogelstein és Kinzler, 1992). Az emberi papillóma vírus E6 fehérje felelős a p53 inaktiválásáért. Az UCE5b a vírus fehérje jelenlétében ubiquitinálja a p53-at, de ha nincs jelen a vírus, akkor az UCE5b nem képes ellátni ezt a szerepét.

Munkánk eredményeképpen feltételezhetjük, hogy szoros a kapcsolat az MSV életciklusa és a kukorica sejtek sejtciklusa között. Ezt támasztja alá a virális promóterek sejtciklus függő expressziója, továbbá erre utalnak az élesztő két-hibrid rendszerrel kapott eredményeink. A jövőben más sejtciklus markergének, mint például a PCNA, CDK, ciklinek valamint olyan fehérjék elleni antitestek alkalmazása, amelyek a sejtciklus csak egy bizonyos szakaszában működőképesek hozzájárulhatnak ahhoz, hogy újabb információkat kaphassunk a geminivírussal fertőzött növényi sejt sejtciklus szabályozásának molekuláris mechanizmusairól.

VII. A fontosabb tudományos eredmények összefoglalása

A kukorica transzformációs rendszer használata lehetővé tette virális szekvencia szakaszok promóterként történő aktivitásának vizsgálatát. A végzett kísérletek rámutattak a következőkre:

1. Az MSV két különböző hosszúságú replikációs fehérje promóterei transzgenikus kukorica növények gyökereiben virális fehérjék jelenléte nélkül is aktívak. A promóterek expressziója főleg az osztódó sejteket tartalmazó merisztématis régiókra (gyökércsúcs, oldalgyökér kezdemény) korlátozódik.
2. A 2,4-D közvetlenül nem, azonban a sejtciklus aktiválása révén közvetve megemeli a virális promóterek expresszióját.
3. A transzgenikus kukorica sejtszuszpenzió szinkronizálásának eredményei azt mutatják, hogy a burokfehérje ezen promóter szakasza a sejtciklus korai G2-fázisában működik a legaktívabban. A replikációs fehérje promóterének expressziója pedig a korai S-fázisban a hiszton H4 transzkripciója előtt, majd a G2 fázisban tapasztalható.
4. A C2-es fehérje körülbelül a duplájára növelte, a burokfehérje pedig megközelítőleg a felére csökkentette a virion-szensz gének aktivitását.

Élesztő két-hibrid rendszer segítségével kimutattuk, hogy:

5. Fehérje-fehérje kölcsönhatás létezik: (a) C1C2 replikációs fehérje és a kukorica G10 transzkripció faktor, valamint (b) a C1C2 replikációs fehérje és egy kukorica ubiquitin-konjugáló enzim között.

VIII. Referencia

Abouzid, A. M., Barth, A., and Jeske, H. 1988. Immunogold labeling of the Abutilon mosaic virus in ultrathin section of epoxy resin embedded leaf tissue. J. Ultrastruct. Molec. Struct. Res. 99: 38-47.

Accotto GP, Mullineaux PM, Brown SC, Marie D. (1993) Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in S-phase nuclei of infected cells. Virology. **195** 257-259

Ach RA, Durfee T, Miller AB, Taranto P, Hanley-Bowdoin L, Zambriski PC, and Gruissem W (1997) An alternatively spliced, multigene family in maize encodes retinoblastoma-related proteins wich can interact with a plant D-type cyclin and a geminivirus replication protein. Mol. Cell. Biol. **17** 5077-5086

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson DJ (1994) Molecular biology of the cell, Third edition, Garland Publish, Inc., New York-London

Alizadeh S, Mantell SH (1991). Early cellular events during direct somatic embriogenesis in cotyledon explants of *Solanum aviculare*. Forst. Ann. Bot. **67** 257-263

Aloni, R (1987). The induction of vascular tissues by auxin. In Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and development (Davies, P.J., ed.) Dordrecht:Kluwer Academic Publisher, pp. 363-374

Arguello-Astorga GR, Guevara-Gonzalez RG, Herrera-Estrella LR, Rivera-Bustamante RF (1994) Geminivirus replication origins have a group-specific organisation of iterative elements: A model for replication. Virology **203** 90-100

Atanassova R, Flénet M, Gigot C, and Chaubet N (1998). Functional analysis of the promóter region of a maize (*Zea mays* L.) H3 histone gene in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology **37** 275-285

Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R, and Fields S (1993) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In: Hartley DA Cellular Interactions in Development: A practical Approach, pp. 153-179.

Beeckman T, and Engler G (1994) An easy technique for the clearing of histochemically stained plant tissue. Plant Mol. Biol. Rep. **12** 37-42

Beer-Romero P, Glass S, Rolfe M (1997) Antisense targeting of E6AP elevates p53 in HPV-infected cells but not in normal cells. Oncogene **14** 595-602

Bejarano ER, Khashoggi A, Witty M, and Lichsteinstein C, (1996) Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** 759-764

Benfey PN, Ren L, and Chua NH (1990). Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomain in early stages of plant development. *The EMBO Journal* **9** 1677-1684

den Boer BG, Murray JA (2000) Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol.* **10** 245-250

Bouchez, Tokhuisa, Llewellyn, Dennis, and Ellis (1989). The ocs-element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes. *The EMBO Journal* **8** 4197-4204

Boulton MI, Steinkellner H, Donson J, Markham PG, King DI, and Davies JW (1989). Mutational analysis of the virion-sense genes of maize streak virus. *Journal of General Virology* **70** 2309-2323

Boulton MI, King DI, Donson J, and Davies JW (1991) Point substitution in a promoter-like region and the V1 gene affect the host range and symptoms of maize streak virus. *Virology* **183** 114-121

Boulton MI, Pallaghy CK, Chatani M, MacFarlane S, and Davies JW (1993). Replication of maize streak virus mutants in maize protoplasts: evidence for a movement protein *Virology* **192** 85-93

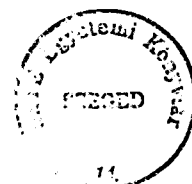
Brough CL, Sunter G, Gardiner WE, and Bisaro DM (1992) Kinetics of tomato golden mosaic virus DNA replication and coat protein promoter activity in *Nicotiana-tabacum* protoplasts. *Virology* **187** 1-9

Chaubet ME, Chaubet N, Clement B, Gigot C, Philipps G (1998) Polyadenylation of histone H3 and H4 mRNAs in dicotyledonous plants. *Gene* **71** 217-223

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162** 156-159

Cline, M. (1994). The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiol. Plant.* **90** 230-237

Christensen AH, and Quail PH (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* **5** 213-218



Collin S, Fernandezlobato M, Gooding PS, Mullineaux PM, Fenoll C (1996) The two nonstructural proteins from wheat dwarf virus involved in viral gene expression and replication are retinoblastoma- binding proteins. *Virology* **219** 324-329

Damania B, Alwine JC. (1996) TAF-like function of SV40 large T antigen. *Genes Dev.* **10** 1369-1381

Depamphilis ML (1987) Replication of simian virus40 and polyoma virus chromosomes. In *Molecular Aspects of Papovaviruses*, pp. 1-40

Doonan J and Fobert P (1997) Conserved and novel regulators of the plant cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** 824-830

Doonan J. (2000) Social controls on cell proliferation in plants. *Curr Opin Plant Biol.* **3** 482-7.

Dudits D, Bögre L, Bakó L, Dedeoglu D, Magyar Z, Kapros T, Felföldi F, and Györgyey J (1993) Key component of cell cycle control during auxin-induced cell division *Molecular and Cell Biology of the Plant Cell Cycle*, Pages 111-131. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.

Dudits D, Magyar Z, Deák M, Mészáros T, Miskolczi P, Fehér A, Brown S, Kondorosi E, Athanasiadis A, Pongor S, Bakó L, Koncz C and Györgyey J (1998) Cyclin- and calcium-dependent kinase families: response of cell division to hormones and stress signals. In Francis D, Dudits D, Inzé D (eds). *Plant Cell Division*, pp. 21-46 Portland Press, London.

Dudits D (1999) A sejtsztódás differenciálódás és az egyedfejlődési program szabályozásának molekuláris alapjai. Szerk: Balázs Ervin-Dudits Dénes *Molekuláris növénybiológia* oldalak: 249-298 Akadémiai Kiadó Budapest

Eagle PA, Orozco BM, and Hanley-Bowdoin L (1994) A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell* **6** 1157-1170

Eagle PA, and Hanley-Bowdoin L (1997) Cis-elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and efficient DNA replication. *J. Virol*: **71** 6947-6955

Eckner R, Ludlow JW, Lill NL, Oldread E, Arany Z, Modjtahedi N, Decaprio JA, Livingston DM, and Morgan JA (1996) Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen. *Mol. Cell. Biol.* **16** 3454-3464

Elmer JS, Brand L, Sunter G, Gardiner WE, Bisaro DM, Rogers SG (1988) Genetic analysis of tomato golden mosaic virus. Requirement for the product of the highly conserved AL1 coding sequence for replication. *Nucleic Acids Res.* **16** 7043-7060

Ermak G, Paszkowski U, Wohlmuth M, Scheid OM, and Paszkowski J (1993) Cytosine methylation inhibits replication of African cassava mosaic virus by two distinct mechanisms. *Nucleic Acids Res.* **21** 3445-3450

Esau K, and Hoefler LL (1978) Hyperplastic phloem in sugar beet leaves infected with the beet curly top virus. *Am. J. Bot.* **65** 772-783

Feilottter HE, Hannon GJ, Ruddel CJ, and Beach D (1994) Construction of an improved host strain for two-hybrid screening. *Nucl. Acids. Res.* **22** 1502-1503

Fenoll C, Black DM, and Howell SH (1988) The intergenic region of maize streak virus contains promoter elements involved in rightward transcription of the viral genome. *EMBO J.* **7** 1589

Fenoll C, Schwarz JJ, Black DM, Schneider M, and Howell SH (1990). The intergenic region of maize streak virus contains a GC-rich element that activates rightward transcription and bind maize nuclear factors. *Plant Molecular Biology* **15** 865-877

Fontes EPB, Luckow VA, and Hanley-Bowdoin L (1992) A geminivirus replication protein is sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell* **4** 597-608

Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, and Firoozabady E (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220** 1049-1051

Gooding PS, Batty NP, Gouldsbrough AP, and Mullineaux P (1999). Plant cell-directed control of virion sense gene expression in wheat dwarf virus. *Nucleic Acid Res.* **27** 1709-1718

Grafi G, Burnett RJ, Helentjaris T, Larkins BA, Decaprio JA, Sellers WR, and Kaelin WG (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: Involvement in endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** 8962- 8967

Gruda MC, Zabolotny JM, Xiao JH, Davidson I, Alwine JC. (1993) Transcriptional activation by simian virus 40 large T antigen: interactions with multiple components of the transcription complex. *Mol Cell Biol.* **13** 961-969

Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T., Murfett, J. 1998. How does auxin turn on genes? *Plant Physiol.* **118**:341-347.

Gutierrez C. 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* **19**:792-799.

Guzzo F, Baldan B, Levi M, Sparvoli E, Schiavo F, Terzi M, and Mariani P (1995). Early cellular events during induction of carrot explant with 2,4-D. **185** 28-36

Haley A, Zhan XC, Richardson K, and Morris B (1992) Regulation of the activities of African cassava mosaic virus promoters by the AC1, AC2, and AC3 gene products. *Virology* **188** 905-909

Hamel PA, Gallie BI, and Phillips RA (1992) The retinoblastoma protein and cell cycle regulation. *Trends Genet* **8** 180-185

Hamilton WDO, Stein VE, Coutts RHA, and Buck KW (1984). Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA component of tomato golden mosaic virus: potential coding regions and regulatory sequences. *EMBO J.* **3** 2197-2205

Hanley-Bowdoin L, Settlage SB, Orozco BM, Nagar S, and Robertson D (1999). Geminiviruses: Models for Plant DNA Replication, Transcription, and Cell Cycle Regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences.* **18** 71-106

Herwig S, Strauss M. (1997) The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur J Biochem.* **246** 581-601

Hofer JMI, Dekker EL, Rynolds HV, Woolston CJ, Cox BS, and Mullineaux PM (1992). Coordinate regulation of replication and virion sense gene expression in wheat dwarf virus. *Plant Cell* **4** 213-223

Hong Y, and Stanley J (1995). Regulation of African cassava mosaic virus complementary-sense gene expression by N-terminal sequences of the replication-associated protein AC1. *Journal of General Virology* **76** 2415-2422

Horvath GV, Pettko-Szandtner A, Nikovics K, Bilgin M, Boulton MI, Davies JW, Gutierrez C, and Dudits D (1998) Prediction of functional region of the maize streak virus replication-associated proteins by protein-protein interaction analysis. *Plant Mol. Biol.* **38** 699-712

Howard AJ, Caton J, Bossert M, and Goodman RM (1985) Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and model for gene regulation in geminiviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82** 3572-3576

Huntley R, Healy S, Freeman D, Lavender P, de Jager S, Greenwood J, Makker J, Walker E, Jackman M, Xie Q, Bannister AJ, Kouzarides T, Gutierrez C, Doonan JH, Murray JA. (1998) The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol.* **37** 155-169

Huntley RP, Murray JA. (1999) The plant cell cycle. *Curr Opin Plant Biol.* **2** 440-446

Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96** 23-28

Ito K, Asano M, Hughes P, Kohzaki H, Kerppola T, Curran T, Murakami Y, and Ito Y (1996) c-Jun stimulates origin-dependent DNA unwinding by polyomavirus large T antigen. *EMBO J.* **15** 5636-5646

Jansen-Durr P. (1996) How viral oncogenes make the cell cycle. *Trends Genet.* **12** 270-275

Jefferson RA, Kavanagh TA, and Bevan MV (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6** 3901-3907

Kiss-Laszlo Z, and Hohn T (1996) Pararetro-and retrovirus RNA: Splicing and the control of nuclear export. *Trends Microb.* **4** 480- 485

Kjemtrup S, Sampson KS, Peele C, Long LV, Conkling MA, Thompson WF, and Robertson D (1998) Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant J.* **14** 91-100

Kong LJ, Orozco BM, Roe JL, Nagar S, Ou S, Feiler HS, Durfee T, Miller AB, Gruissem W, Robertson D, Hanley-Bowdoin L. (2000) A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J.* **19** 3485-3495

Labrie C, Lee BH, Mathews MB. (1995) Transcription factors RFX1/EF-C and ATF-1 associate with the adenovirus E1A-responsive element of the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *Nucleic Acids Res.* **23** 3732-3741

Latham JR, Saunders K, Pinner MS, and Stanley J (1997) Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *Plant J.* **11** 1273-1283

Lazarowitz SG, Pinder AJ, Damsteegt VD, and Rogers SG (1989). Maize streak virus genes essential for systemic spread and symptom development. *EMBO Journal* **8** 1023-1032

Lazarowitz SG (1992). Geminiviruses: genome structure and genome function. *Critical Reviews in Plant Sciences* **11** 327-349

Lee WS, Kao CC, Bryant GO, Liu X, Berk AJ. (1991) Adenovirus E1A activation domain binds the basic repeat in the TATA box transcription factor. *Cell.* **18** 365-376

Li R, and Botchan MR (1994) Acidic transcription factors alleviate nucleosome-mediated repression of DNA replication of bovine papillomavirus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** 7051-7055

Liu H, Boulton MI, and Davies JW (1997). Maize streak virus coat protein bind single- and double- stranded DNA in vitro. *Journal of General Virology* **78** 1265-1270

Liu H, Boulton MI, Oparka KJ, Davies JW. (2001) Interaction of the movement and coat proteins of Maize streak virus: implications for the transport of viral DNA. *J Gen Virol.* **82** 35-44

Lucy AP, Boulton MI, Davies JW, and Maule AJ (1996) Tissue specificity of *Zea mays* infection by maize streak virus. *Mol. Plant Microbe Int* **9** 22-31

Magyar Z, Mészáros T, Miskolczi P, Deák M, Fehér A, Brown S, Kondorosi E, Athanasiadis A, Pongor S, Bilgin M, Bakó L, Koncz C, Dudits D (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronised alfalfa cells. *Plant Cell* **9** 223-235

Mayda, E., Marques, C., Conejero, V., and Vera, P. 2000. Expression of a pathogen-induced gene can be mimicked by auxin insensitivity. *Mol Plant-Microbe Interact.* **13**: 23-31.

Meszaros T, Miskolczi P, Ayaydin F, Pettko-Szandtner A, Peres A, Magyar Z, Horvath GV, Bako L, Feher A, Dudits D. (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Mol Biol.* **43** 595-605.

Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* **374** 131-134

Mórocz S, Donn G, Németh J, Dudits D (1990) An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplast isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theor. Appl. Genet.* **80** 721-726

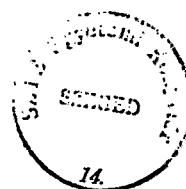
Morris-Krsinich BAM, Mullineaux PM, Donson J, Boulton MI, Markham PG, Short MN, and Davies JW (1985). Bidirectional transcription of maize streak virus DNA and identification of the coat protein gene. *Nucleic Acids Research* **13** 7237-7256

Muday GK, Haworth P (1994) Tomato root growth, gravitropism, and lateral development: correlation with auxin transport. *Plant. Physiol. Biochem.* **32** 193-203

Mul YM, and Vandervliet PC (1992) Nuclear factor-I enhances adenovirus DNA replication by increasing the stability of a preinitiation complex. *EMBO J.* **11** 751-760

Mullineaux PM, Donson J, Morris-Krsinich BAM, Boulton MI, and Davies JW (1984). The nucleotide sequence of maize streak virus DNA. *EMBO Journal* **3** 3063-3068

Mullineaux PM, Rigden JE, Dry IB, Krake LR, and Rezaian MA (1993) Mapping of the polycistronic RNAs of tomato leaf curl geminivirus. *Virology* **193** 414-423



Nagar S, Pedersen TJ, Carrick K, Hanley-Bowdoin L, and Robertson D (1995) A geminivirus induces expression of a host DNA replication protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* **7** 705-719

Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A. (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J.* **18** 243-252

Nigg EA (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bio Essays* **17** 471-480

Niggeweg R, Thurow C, Kegler C, Gatz (2000) Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of as-1-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of as-1-containing target promoters. *J Biol Chem.* **30** 19897-19905

Noris EJ, Acotto GP, and Gronenborg B (1996) DNA-binding activity of the C2 protein of tomato yellow leaf curl geminivirus. *Virology* **217** 607-612

Oda E, Shirasuna K, Suzuki M, Nakano K, Nakajima T, Oda K. (1998) Cloning and characterization of a GC-box binding protein, G10BP-1, responsible for repression of the rat fibronectin gene. *Mol Cell Biol.* **18** 4772-4782

Omirulleh S, Abraham M, Golovkin M, Stefanov I, Karabaev MK, Mustardy L, Morocz S, Dudits D (1993) Activity of a chimeric promoter with the doubled Ca MV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Mol. Biol.* **21** 415-428

Orozco BM, and Hanley-Bowdoin L (1996) A DNA structure is required for geminivirus origin function. *J. Virol.* **270** 148-158

Padidam M, Beachy RN, and Fauquet CM (1996) The role of AV2 precoat and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology* **224** 390-404

Pasternak T, Miskolczi P, Ayaydin F, Mészáros T, Dudits D and Fehér A (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regulation* (in press)

Peres A, Ayaydin F, Nikovics K, Gutiérrez C, Horváth VG, Dudits D, and Fehér A (1999). Partial synchronisation of cell division in cultured maize cells: differential cyclin, cdc2, histone and retinoblastoma transcript accumulation during the cell cycle *J. Exp. Botany* **50** 1373-1379

Philipps G, Chaubet N, Chaubet ME, Ehling M, Gigot C (1986) Genomic organization and nucleotide sequences of two corn H4 genes. *Gene* **42** 225-229

Renaudin JP, Colasanti J, Rime H, Yuan Z, Sundaresan V (1994) Cloning of four cyclins from maize indicates that higher plants have three structurally distinct groups of mitotic cyclins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91** 7375-7379

Rigden JE, Dry IB, Krake LR, and Rezaian MA (1996) Plant virus DNA replication processes in *Agrobacterium*: Insight into the origins of geminiviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** 10280- 10284

Renaudin JP, Doonaan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inzé D, Jacobs T, Kouchi H, Rouze P, Sauter M, Savoure A, Sorrell DA, Sundaresan V, and Murray JA (1996). Plant cyclins a unified nomenclature for A-,B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant. Mol. Biol.* **32** 1003-1018

Rolfe M, Beer-Romero P, Glass S, Eckstein J, Berdo I, Theodoras A, Pagano M, Draetta G. (1995) Reconstitution of p53-ubiquitinylation reactions from purified components: the role of human ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 and E6-associated protein (E6AP). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92** 3264-3268

Ruiz-Medrano, R., Guevara-Gonzalez R. G., Arguella-Astorga, G. R., Monsalve-Fonnegra, Z., Herrera-Estrella, L. R., and Rivera-Bustamante, R. F. 1999. Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the pepper huasteco virus coat protein gene. *Virology* 253:162-169.

Rushing, A. E., Sunter, G., Gardiner, W. E., Dute, R. R., and Bisaro, D. M. 1987. Ultrastructural aspects of tomato golden mosaic virus infection in tobacco. *Phytopathology* 77:1231-1236.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanderfoot AA, Ingham DJ, and Lazarowitz SG (1996a) A viral movement protein as a nuclear shuttle- the geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiol.* **110** 23-33

Sanderfoot AA, and Lazarowitz SG (1996b) Getting it together in plant virus movement: Cooperative interaction between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol.* **6** 353-358

Satyanarayana T, Gowda S, Mawassi M, Albiach-Marti MR, Ayllon MA, Robertson C, Garnsey SM, Dawson WO. (2000) Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly *Virology.* **278** 253-265

Sauter M (1997) Differential expression of a CAK (cdc2-activating kinase)-like protein kinase, cyclins and cdc2 genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin. *Plant J.* **11** 181-190

Scarano, F. J., Laffin, J. A., Lehman, J. M., and Friedrich, T. D. 1994. Simian virus 40 prevents activation of M-phase-promoting factor during lytic infection. *J Virol.* **68**:2355-2361.

Schiestl RH, Gietz D (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16** 339-346

Sidle A, Palaty C, Dirks P, Wiggan O, Kiess M, Gill RM, Wong AK, Hamel PA. (1996) Activity of the retinoblastoma family proteins, pRb, p107, and p130, during cellular proliferation and differentiation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **31** 237-271

Staiger C, and Doonan J (1993) Cell division in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5** 226-231

Sung YK és Coutts RHA (1995) Mutational analysis of potato yellow mosaic geminivirus. *J. Gen. Virol.* **76** 1773-1780

Sunter G, and Bisaro DM (1989) Transcription map of the B genome component of tomato golden mosaic virus and comparison with A component transcript. *Virology* **173** 647-655

Sunter G, Hartitz MD, and Bisaro DM (1993) Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: Autoregulation of geminivirus replication protein *Virology* **195** 275-280

Sunter G, and Bisaro DM (1997). Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology* **232** 269-280

Suzuki M, Kuroda C, Oda E, Tsunoda S, Nakamura T, Nakajima T, and Oda K (1995) G10BP, an E1A-inducible negative regulator of Sp1, represses transcription of the Rat fibronectin gene. *Mol. and Cell.Biol.* **15** 5423-5433

Szczyglowski, K., Szabados, L., Fujimoto, S. Y., Silver, D., and de Bruijn, F. J. 1994 Site-specific mutagenesis of the nodule-infected cell expression (NICE) element and the AT-rich element ATRE-BS2* of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *glb3* promoter. *Plant Cell* **6**:317-332.

Terada R, Nakayama T, Iwabuchi M, and Shimamoto K (1995). A type I element composed of the hexamer (ACGTA) and octamer (CGCGGATC) motifs plays a role(s) in meristematic expression of a wheat histone H3 gene in transgenic rice plants. *Plant Molecular Biology* **27** 17-26

Thommes PA, and Buck KW (1994) Synthesis of the tomato golden mosaic virus AL1, AL2, AL3, and AL4 proteins *in vitro*. J. Gen. Virol. **75** 1827-1834

Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V., and Vera, P. 1997. Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. Mol Plant-Microbe Interact. **10**:624-634.

Vetten NC, and Ferl RJ (1994) Transcriptional regulation of environmentally inducible genes in plants by an evolutionary conserved family of G-box binding factors. Int. J. Biochem. **26** 1055-1068

Vogelstein B, Kinzler KW (1992) p53 function and dysfunction. Cell. **70** 523-526

Vousden K (1993) Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. FASEB J. **7** 872-879

Wang JYJ, Knudsen ES, and Welch PJ (1994) The retinoblastoma tumor suppressor protein. In Advances in Cancer Research, vol. 64, pp. 25-85

Ward BM, Medville R, Lazarowitz SG, and Turgeon R (1997) The geminivirus BL1 movement protein is associated with endoplasmic reticulum-derived tubules in developing phloem cells. J. Virol. **71** 3726-3733

Wartig L, KheyrPour A, Noris E, DEKouchkovsky F, Jouanneau F, Gronenborn B, and Jupin I (1997) Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: Roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. Virology **228** 132-140

Webster, B.D., and Radin, J.W. (1972). Growth and development of cultured radish roots. Am.J.Bot. **59** 744-751

Woolston CJ, Reynolds HV, Stacey NJ and Mullineaux PM (1989) Replication of Wheat dwarf virus DNA in protoplast and analysis of coat protein mutants in protoplasts and plants. Nucleic Acids Res. **17** 6029-6041

Wright EA, Heckel T, Groenendijk J, Dawies JW, and Boulton MI (1997). Splicing features in maize streak virus virion- and complementary-sense gene expression. The Plant Journal **6** 1285-1297

Xie Q, Sanz-Burgos P, Hannon GJ, and Gutierrez C (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. EMBO J. **15** 4900-4908

Yang T, Law DM and Davies PJ (1993) Magnitude and kinetics of stem elongation induced by exogenous indole-3-acetic acid in intact light-grown pea seedlings. *Plant Physiol.* **102** 717-724

Zhan X, Haley A, Richardson K, and Morris B (1991) Analysis of the potential promoter sequence of African cassava mosaic virus by transient expression of the B-glucuronidase gene. *J. Gen. Virol.* **72** 2849-2852

Zhan XC, Richardson K, Haley A, and Morris BAM (1993). The activity of the coat protein promoter of chloris striate mosaic virus is enhanced by its own and C1C2 gene products. *Virology* **193** 498-502

Summary

It is believed that the geminiviral DNA replication is coupled to the cell cycle regulatory complex of the plant cell and by this way virus early gene products may manipulate the regulation of the cycle. Little is known about promoter functions of the mastreviruses. We examined expression from the promoters of *Maize streak virus* (MSV) in transgenic maize plants. Maize protoplasts were transformed with the prREPK or prREPN construct. The prREPK construct contains a short version of the *rep* promoter, the prREPN construct contains an extended version of the *rep* promoter. In the current study, both of the MSV *rep* promoters were active only in the meristematic tissues, in the roots of the transgenic maize plantlets. However, the "long" promoter produced higher GUS activity in the roots of these plants. This suggests the presence of positive regulatory *cis*-elements outside the LIR (large intergenic region) and *mp* gene. In all examined cases, staining was observed in the root tip and in the lateral root primordia. Young root tips stained more strongly than older ones. Staining in the meristematic tissues indicates that the MSV *rep* promoters are active in dividing cells. No GUS activity could be detected in leaves or shoots of plants. The absence of GUS staining can be explained in two ways; either the activities of the promoters were too low to be assessed in the pigmented parts of the plants, or the promoters were not active in vegetative tissues.

A synthetic auxin (2,4-D) can activate the plant cell division cycle through a complex signalling pathway (Dudits et al, 1993). To determine whether such activation could influence expression from the MSV promoters, roots of maize plantlets transgenic for the prREPK or prREPKL construct were treated with 2,4-D. The roots were assayed for BrdU incorporation and the same roots were used for histochemical assay of GUS activity. Incubation of plantlets transformed with prREPK or prREPN in the presence of 2,4D resulted in similar increases in cell division frequency and GUS activity. These data suggest a strong correlation between the level of BrdU incorporation and GUS activity and support our assumption that the MSV *rep* promoter is active in cycling cells. To determine whether auxin treatment affects the activity of MSV promoters in non-differentiated cells, transgenic maize cell suspensions were used. Cells were incubated in a medium supplemented with 2,4-D and samples were taken at 1, 3 and 48 h post addition. Approximately two-fold

increases in promoter activity were obtained 2 days after 2,4D treatment of cells transformed with prBF, prREPK or prREPN. According to our findings the response of viral promoters to auxin is a late event. Therefore, we suggest that the observed changes in viral promoter function possibly linked to the cell cycle action. Nevertheless further experimentation will be required to determine whether the MSV *cp* and *rep* promoters respond to the auxin *per se* or whether the increase in their activity is due to increased cell division (via reactivation of the cell cycle).

To further investigate the potential cell cycle phase-specific activation of MSV promoters the transgenic maize cell suspensions were cultured in hydroxyurea. Using this method approximately 47 % of the suspension cells were blocked in S phase, resulting in a partial synchrony in cell cycle progression. The removal of the hydroxyurea did not effect the maintained partial synchrony during the experimental period. Analysis of reporter gene and cell-cycle-specific gene transcript levels coupled with flow cytometric data in synchronised transgenic maize cells revealed cell cycle specificity of the MSV promoters. These experiments indicated that the *cp* and *rep* promoters were expressed at slightly different points of the cell cycle. The coat protein gene promoter showed highest activity in early G2, while the *rep* promoter showed two peaks of activity, in the S and G2 cell cycle phases.

Accumulated experimental results indicated that the presence of viral proteins influenced viral promoter activity. To evaluate the effect of the MSV protein fragments on the virion sense gene expression, different constructs expressing the C1, C2, C1C2 and V2 coding regions under the regulation of ubiquitin promoter were produced. Coat protein gene promoter-GUS reporter gene transformed transgenic maize cell lines were transformed with these constructs and β -glucoronidase activities were measured in total cellular protein extracts on the third day after transformation. The results show that C1 and C1C2 proteins did not influence gene expression driven by the coat protein gene promoter, while protein encoded by the C2 open reading frame doubled the GUS activity in the transgenic lines. The effects of MSV coat protein (*cp*) on the activity of viral promoters and tissue specificity of these promoters were analysed. For this end, we produced stable transformant maize cell lines. They expressed either (or both) GUS reporter gene or MSV *cp* gene under the control of the 3 tested promoters or ubiquitin promoter, respectively. We could demonstrate that coat protein could decrease by 50 % the activity of *cp* gene promoter both in transient expression experiments and in stable transformants.

We have used the yeast two-hybrid system to screen a cDNA library prepared from maize embryogenic callus and identified interacting protein partners of MSV C1C2 protein. Our studies identified a strong interaction between C1C2 protein and maize G10 transcription factor. Animal G10 is a repressor, and can bind to GC-rich sequences in the promoters. Another interacting protein was a ubiquitin-conjugating enzyme (UCE5b). Human UBC5b may be involved in the degradation of regulatory proteins which are often short-lived.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet témavezetőimnek Dr. Horváth V. Gábornak és Prof. Dr. Dudits Dénesnek a Ph.D dolgozatom elkészítéséhez nyújtott segítségükért. Külön megköszönöm Prof. Dr. Dudits Dénesnek a lehetőséget, hogy a csoportjában dolgozhattam. Dr Margaret I. Boultonnak, és Jeffrey W. Daviesnek, akik a munkánkhoz rendelkezésünkre bocsájtották az általuk is vizsgált vírust.

Hálás vagyok valamennyi munkatársamnak, különösen Julietta Simidjievának, Adrian Peresnek, Ferhan Ayaydinnak, Taras Pasternaknak a sok segítségért, amit a munka minden fázisában nyújtottak. Dr. Györgyey Jánosnak a hasznos tanácsokért és Lendvai Ágnesnek azért a segítségért, amit a magyar nyelvtan és helyesírás terén nyújtott.

Végül férjemnek, Kelemen Zsoltnak köszönöm, hogy az élet minden területén mellém állt, és a támogatásáról biztosított.